

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**ÉTUDE DE L'IMPLICATION DES MÉCANISMES INFLAMMATOIRES  
DANS LE DÉVELOPPEMENT DE L'HYPERREACTIVITÉ BRONCHIQUE  
DANS UN NOUVEAU MODÈLE ANIMAL D'INFLAMMATION  
PULMONAIRE.**

par

**KARIM MAGHNI**

Département de pharmacologie

Thèse présentée à la faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiae Doctorae (Ph.D.)

Août 1996



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services Branch

395 Wellington Street  
Ottawa, Ontario  
K1A 0N4

Bibliothèque nationale  
du Canada

Direction des acquisitions et  
des services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa (Ontario)  
K1A 0N4

*Your file    Votre référence*

*Our file    Notre référence*

**The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.**

**L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.**

**The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.**

**L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.**

ISBN 0-612-15455-6

**Canada**

## TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTES DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xviii
RÉSUMÉ.....	

xiv

### INTRODUCTION

1	PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ASTHME.....	1
2	L'HYPERRÉACTIVITÉ BRONCHIQUE .....	2
2.1	Définition.....	2
2.2	Mesure de l'HRB.....	3
2.3	Étiologie de l'HRB.....	6
3	FACTEURS POTENTIELLEMENT RESPONSABLES DE L'HRB.....	8
3.1	Altérations du système nerveux autonome.....	8
3.2	Épithélium bronchique.....	9
3.3	Muscle lisse bronchique.....	11
3.4	Perméabilité microvasculaire et oedème.....	13
3.5	Cellules et médiateurs inflammatoires.....	16
3.5.1	Les mastocytes.....	16
3.5.2	Les monocytes-macrophages.....	19
3.5.3	Les neutrophiles.....	20
3.5.4	Les lymphocytes.....	21
3.5.5	Les éosinophiles.....	23

4	OBJECTIFS DE L' ÉTUDE.....	38
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>		
1	INDUCTION DE L'INFLAMMATION PULMONAIRE CHEZ LE COBAYE.....	41
1.1	Injection des billes de Sephadex.....	41
1.2	Mesure de l'influx de cellules inflammatoires.....	42
1.2.1	Énumération des éosinophiles sanguins.....	42
1.2.2	Populations cellulaires du liquide du lavage bronchoalvéolaire (LBA).....	44
2	MESURE <i>EX VIVO</i> DE LA RÉACTIVITÉ DES VOIES AÉRIENNES DE COBAYE.....	45
3	HISTOLOGIE.....	47
4	TEMPS DE MESURE DES DIVERS PARAMÈTRES.....	48
5	ÉTUDES DES MÉCANISMES POTENTIELLEMENT IMPLIQUÉS DANS L'HYPERRÉACTIVITÉ BRONCHIQUE.....	48
5.1	Détermination du nombre d'éosinophiles tissulaires et de l'activation des éosinophiles.....	49
5.2	Activation des mastocytes.....	51
5.3	Mesure de la $\beta$ -glucuronidase.....	52
5.4	Perméabilité vasculaire et oedème.....	53
5.5	Perméabilité bronchoalvéolaire.....	55
5.6	Activation du complément sanguin.....	57
6	ANALYSES STATISTIQUES ET ÉTUDES DE CORRÉLATION.....	60
<b>RÉSULTATS</b>		



1	INDUCTION DE L'INFLUX DE CELLULES INFLAMMATOIRES DANS LES POUMONS DE COBAYE SUITE À L'INJECTION DE BILLES DE SEPHADEX.....	61
1.1	Induction par divers types de billes de Sephadex.....	61
1.2	Effets de diverses doses de Sephadex G-50.....	66
2	ÉTUDE DE L'INFLAMMATION PULMONAIRE ET LE L'HRB 1, 7 ET 14 JOURS APRÈS L'INJECTION DES BILLES DE SEPHADEX.....	72
2.1	Cellules inflammatoires dans le LBA.....	72
2.2	Nombre d'éosinophiles sanguins.....	72
2.3	Mesure <i>ex vivo</i> de la réactivité des voies aériennes.....	74
2.3.1	Bronches principales.....	74
2.3.2	Bronches inférieures.....	80
2.3.3	Parenchyme pulmonaire.....	86
2.4	Mesure du nombre d'éosinophiles tissulaires et de l'activation des éosinophiles.....	92
2.4.1	Bronches principales et inférieures.....	92
2.4.2	Activation des éosinophiles.....	92
2.5	Étude histologique.....	97
2.5.1	Bronche principale.....	97
2.5.2	Bronche inférieure.....	97
2.5.3	Parenchyme pulmonaire.....	
	101	
3	CINÉTIQUE DE L'INFLAMMATION PULMONAIRE ET DE L'HRB CHEZ LE COBAYE INJECTÉ AUX BILLES DE SEPHADEX.....	108

3.1	Cinétique de l'HRB.....	
	108	
3.2	Cinétique de l'éosinophilie sanguine.....	112
3.3	Cinétique de l'accumulation des cellules inflammatoires dans le LBA.....	112
3.4	Nombre d'éosinophiles présents dans les voies aériennes.....	118
3.5	Activation des éosinophiles .....	120
4	ÉTUDE DES AUTRES MÉCANISMES POTENTIELLEMENT RESPONSABLES DE L'HRB.....	121
4.1	Implication des neutrophiles.....	121
4.2	Libération de $\beta$ -glucuronidase.....	121
4.3	Activation des mastocytes.....	125
4.4	Mesure de la perméabilité microvasculaire et de l'oedème....	128
4.5	Mesure de la perméabilité capillaire bronchoalvéolaire.....	142
4.6	Activation du complément sanguin.....	146
5	ÉTUDE DE CORRÉLATION ENTRE LES DIVERS PHÉNOMÈNES INFLAMMATOIRES ET LE DÉVELOPPEMENT DE L'HRB.....	151

<b>DISCUSSION.....</b>	<b>153</b>
------------------------	------------

<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>181</b>
-------------------------	------------

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>185</b>
---------------------------	------------

<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>187</b>
---------------------------	------------

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1: Taille et nombre absolu des billes de Sephadex de type G-50, G-75, G-100 et G-200 (Superfine) pour un poids identique de billes (10 mg). 62
- Figure 2: Nombre de cellules totales retrouvées dans le LBA 24 hrs après l'injection de doses décroissantes de billes de Sephadex G-50 chez le cobaye. 63
- Figure 3: Populations cellulaires retrouvées dans le LBA 1 jour après l'injection de doses décroissantes de billes de Sephadex G-50 chez le cobaye. 65
- Figure 4: Courbes dose-réponses à l'histamine de la bronche principale provenant de cobayes témoins (cercle vide) et injectés aux billes de Sephadex G-50 (cercle plein) 1 (A), 7 (B) et 14 (C) jours après l'injection des billes. 70
- Figure 5: Courbes dose-réponses à l'acétylcholine de la bronche principale provenant de cobayes témoins (cercle vide) et injectés aux billes de Sephadex G-50 (cercle plein) 1 (A), 7 (B) et 14 (C) jours après l'injection des billes. 72
- Figure 6: Courbes dose-réponses à l'histamine de la bronche inférieure provenant de cobayes témoins (cercle vide) et injectés aux billes

de Sephadex G-50 (cercle plein) 1 (A), 7 (B) et 14 (C) jours après l'injection des billes. 75

Figure 7: Courbes dose-réponses à l'acétylcholine de la bronche inférieure provenant de cobayes témoins (cercle vide) et injectés aux billes de Sephadex G-50 (cercle plein) 1 (A), 7 (B) et 14 (C) jours après l'injection des billes. 77

Figure 8: Courbes dose-réponses à l'histamine du parenchyme pulmonaire provenant de cobayes témoins (cercle vide) et injectés aux billes de Sephadex G-50 (cercle plein) 1 (A), 7 (B) et 14 (C) jours après l'injection des billes. 81

Figure 9: Courbes dose-réponses à l'acétylcholine du parenchyme pulmonaire provenant de cobayes témoins (cercle vide) et injectés aux billes de Sephadex G-50 (cercle plein) 1 (A), 7 (B) et 14 (C) jours après l'injection des billes. 83

Figure 10: Courbe d'étalonnage de la densité optique représentant l'activité EPO des éosinophiles de cobayes en fonction du nombre d'éosinophiles purifiés. 87

Figure 11: Courbe d'étalonnage de la densité optique en fonction du nombre d'unité de peroxydase de raifort. 89

Figure 12: Microscopie optique de la bronche externe (A) et de la bronche inférieure (B) représentatives d'un cobaye témoin (*photographie de gauche*) et d'un cobaye 1 jour après l'injection des billes de Sephadex (*photographie de droite*). 92

Figure 13: Microscopie optique du parenchyme pulmonaire et d'une bronche intrapulmonaire représentatif d'un cobaye témoin 1 jour après l'injection de saline stérile et apyrogène. 96

Figure 14: Microscopie optique du parenchyme pulmonaire (A) et d'une bronche intrapulmonaire (B) représentatifs d'un cobaye injecté aux billes de Sephadex 1 jour après l'injection des billes. 97

Figure 15: Microscopie optique d'une bronche intrapulmonaire (A) et du parenchyme pulmonaire (B) représentatifs d'un cobaye injecté aux billes de Sephadex 7 jours après l'injection des billes. 99

Figure 16: Courbes dose-réponses à l'histamine de la bronche inférieure provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection (voir l'encadré pour la légende des courbes). 103

Figure 17: Nombre de leucocytes totaux (A) et d'éosinophiles (B) contenus dans le sang de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection. 107

Figure 18: Nombre de macrophages (A), d'éosinophiles (B), de neutrophiles (C) et de lymphocytes (D) contenus dans le LBA de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection des billes. 110

Figure 19: Courbes dose-réponses à l'histamine de la bronche inférieure provenant de cobayes témoins et injectés avec des doses de 0.43, 3.86 ou 24 mg/kg de billes de Sephadex 24 hrs après l'injection (voir l'encadré pour la légende des courbes). 116

Figure 20: Courbe d'étalonnage de la densité optique en fonction de la quantité de phénolphthaléine (en  $\mu\text{g/ml}$ ). 117

Figure 21: Courbe d'étalonnage de la densité optique en fonction de la quantité d'histamine (en  $\mu\text{g/ml}$ ). 120

Figure 22: Courbe d'étalonnage de la densité optique en fonction de la quantité de bleu d'Evans (en  $\mu\text{g/ml}$ ). 122

Figure 23: Mesure de l'extravasation de l'albumine plasmatique au niveau de la trachée (A) et de la bronche principale (B) provenant de cobayes témoins (0) et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection. 123

Figure 24: Mesure de l'extravasation de l'albumine plasmatique au niveau de la bronche inférieure proximale (A) et de la bronche

inférieure distale (**B**). provenant de cobayes témoins (0) et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection. 125

Figure 25: Mesure de l'extravasation de l'albumine plasmatique au niveau du parenchyme pulmonaire provenant de cobayes témoins (0) et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection. 127

Figure 26: Mesure de l'extravasation de l'albumine plasmatique au niveau du coeur, du rein, de la rate (**A**), du foie, du pancréas, du duodénum (**B**), du quadriceps droit, du diaphragme et de la peau (**C**) provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection (voir l'encadré pour la légende des colonnes). 129

Figure 27: Mesure de l'extravasation de l'albumine plasmatique au niveau de la trachée (T), de la bronche principale (BP), du parenchyme pulmonaire (PP) (**A**) et de la bronche inférieure proximale (BIP) et distale (BID) (**B**) provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 7 et 14 jours après l'injection (voir l'encadré pour la légende des colonnes). 131

Figure 28: Mesure de la formation d'œdème au niveau de la trachée (T), de la bronche principale (BP), du parenchyme pulmonaire (PP) (**A**), de la bronche inférieure proximale (BIP) et distale (BID)

(**B**), du coeur, du rein et de la rate (**C**) provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection. 133

Figure 29: Courbes d'étalonnages de la densité optique en fonction de la quantité d'albumine (en mg/ml) utilisées pour le dosage des protéines totales (**A**) et de l'albumine (**B**). 136

Figure 30: Exemple de la transformation mathématique selon l'équation de Van Krogh des valeurs de l'essai hémolytique pour un plasma provenant d'un cobaye témoin (**A**) et 3 hrs après l'injection des billes de Sephadex (**B**). 140



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I:	Divers effets des médiateurs de l'inflammation	16
Tableau II:	Type de granules cytoplasmiques présents dans les éosinophiles selon le stade de maturation.	24
Tableau III:	Principales activités biologiques des médiateurs pré-formés présents dans les éosinophiles	26
Tableau IV:	Populations cellulaires retrouvées dans le LBA de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex G-50 (24 mg/kg), 1 jour après l'injection des billes.	57
Tableau V:	Caractéristiques des divers types de billes de Sephadex (Superfine).	59
Tableau VI:	Populations cellulaires retrouvées dans le LBA 24 h après l'injection de divers types de billes de Sephadex (Superfine) chez le cobaye.	60
Tableau VII:	Populations cellulaires retrouvées dans le LBA de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex G-50 1,7 et 14 jours après l'injection des billes.	66

Tableau VIII:	Nombre de leucocytes totaux et d'éosinophiles retrouvés dans le sang de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex G-50 1,7 et 14 jours après l'injection.	68
Tableau IX:	Valeurs des contractions maximales ( $E_{max}$ ) et des affinités apparentes ( $pD_2$ ) de la bronche principale pour l'histamine et l'acétylcholine provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex (24 mg/kg) 1, 7 et 14 jours après l'injection des billes.	74
Tableau X:	Valeurs des contractions maximales ( $E_{max}$ ) et des affinités apparentes ( $pD_2$ ) de la bronche inférieure pour l'histamine et l'acétylcholine provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex (24 mg/kg) 1, 7 et 14 jours après l'injection des billes.	79
Tableau XI:	Valeurs des contractions maximales ( $E_{max}$ ) et des affinités apparentes ( $pD_2$ ) du parenchyme pulmonaire pour l'histamine et l'acétylcholine provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex (24 mg/kg) 1, 7 et 14 jours après l'injection des billes.	85
Tableau XII:	Nombre apparent d'éosinophiles totaux retrouvés dans les bronches principales et inférieures provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 7 et 14 jours après l'injection des billes.	88

Tableau XIII:	Activité EPO totale retrouvée dans le LBA provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 7 et 14 jours après l'injection des billes.	90
Tableau XIV:	Résumé des principales manifestations histopathologiques et de la réactivité bronchique observées au niveau de la bronche principale et de la bronche inférieure provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 7 et 14 jours après l'injection.	94
Tableau XV:	Résumé des principales manifestations histopathologiques et de la réactivité bronchique observées au niveau du parenchyme pulmonaire provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex G-50 1, 7 et 14 jours après l'injection.	101
Tableau XVI:	Valeurs des contractions maximales (en g de contraction) à l'histamine et à l'acétylcholine de la bronche inférieure provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex, 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection.	105
Tableau XVII:	Nombre de leucocytes totaux ( $\times 10^6$ cellules) retrouvés dans le LBA des animaux témoins et injectés aux billes de Sephadex.	109

Tableau XVIII:	Nombre apparent d'éosinophiles contenus dans la bronche inférieure et la bronche principale provenant de cobaye témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection des billes.	113
Tableau XIX:	Activité EPO totale retrouvée dans le LBA des cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection.	114
Tableau XX:	Activité $\beta$ -glucuronidase totale (en unité) retrouvée dans le LBA des cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12, 24, 168 et 386 hrs après l'injection.	118
Tableau XXI:	Quantité totale d'histamine (en $\mu\text{g}$ ) retrouvée dans le LBA des cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12, 24, 168 et 386 hrs après l'injection.	121
Tableau XXII:	Quantité de protéines totales et d'albumine retrouvées dans le LBA des cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12, 24, 168 et 386 hrs après l'injection.	138
Tableau XXIII:	Concentrations du complément sanguin (AP50; unité/ml) dans le plasma provenant de cobaye témoins et injectés	

aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection  
des billes. 142

Tableau XXIV: Activation *in vitro* du complément sanguin par les billes  
de Sephadex, 1, 3 et 6 hrs après l'incubation des billes de  
Sephadex. 143

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

AP	alternative pathway
CLC	charcot-leyden crystal
d	densité
ECP	eosinophil cationic protein
EDN	eosinophil-derived neurotoxin
EpDRF	epithelium-derived relaxant factor
EPO	eosinophil peroxidase
EPX	eosinophil protin X
HRB	hyperréactivité bronchique
Ig	immunoglobuline
IL-	interleukine
LBA	lavage bronchoalvéolaire
LT	leucotriène
MBP	major basic protein
MIP-1 $\alpha$	macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$
NANC	non adrénérquique non cholinérquique
OPD	o-phenylènediamine dihydrochlorure
PAF	platelet activating factor
PG	prostaglandine
TxA <sub>2</sub>	thromboxane A <sub>2</sub>

ÉTUDE DE L'IMPLICATION DES MÉCANISMES INFLAMMATOIRES DANS  
LE DÉVELOPPEMENT DE L'HYPERREACTIVITÉ BRONCHIQUE DANS UN  
NOUVEAU MODÈLE ANIMAL D'INFLAMMATION PULMONAIRE.

par

KARIM MAGHNI

Thèse présentée au département de pharmacologie en vue de l'obtention  
du grade de Philosophiae Doctorae (Ph.D.). Faculté de médecine,  
Université de Sherbrooke

RÉSUMÉ

L'asthme est un syndrome respiratoire caractérisé par la présence d'une hyperréactivité bronchique (HRB) et d'une éosinophilie sanguine et pulmonaire. L'asthme est aussi caractérisé par un bronchospasme, un oedème de la paroi bronchique, une hypersécrétion de mucus, une hyperplasie des cellules de muscle lisse bronchique. Cependant, la participation de l'éosinophilie et des autres événements inflammatoires (et "l'ordre chronologique" de ces événements) dans le développement de l'HRB reste encore mal établie. Le but du présent projet de recherche est d'étudier la participation de divers événements inflammatoires dans le développement et le maintien de l'HRB en utilisant le même modèle animal. L'inflammation pulmonaire et l'éosinophilie furent induites chez le cobaye par l'injection intraveineuse de billes de Sephadex (Dextran). Nous avons ainsi montré que le développement de l'HRB (mesuré *ex vivo*) chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex pourrait être associé au degré de migration des éosinophiles au niveau de la muqueuse et la sous-muqueuse des voies aériennes et à la dégranulation des éosinophiles présents dans la lumière bronchique. Cependant, le nombre d'éosinophiles contenus dans les voies aériennes et dans le lavage bronchoalvéolaire ne semblerait pas relier au développement de l'HRB. Aucune desquamation de l'épithélium bronchique n'a été observée chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex. Le développement de l'HRB pourrait être aussi associé à la dégranulation des mastocytes, à l'augmentation de l'extravasation plasmatique au niveau des voies aériennes et à l'augmentation de la perméabilité bronchoalvéolaire. Le maintien de l'HRB semblerait être relié à la persistance de l'éosinophile sanguine et pulmonaire. Cependant, les autres événements inflammatoires préalablement décrits ne furent plus présents lors du maintien de l'HRB. Enfin, nous avons montré que l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye activait le complément sanguin et que cette activation pourrait provenir d'une interaction directe entre le complément et le Dextran. En conclusion, l'ensemble de nos résultats suggère que le déclenchement de l'HRB chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex pourrait être associé à l'activation de divers événements inflammatoires et pourrait dépendre du degré d'inflammation présent dans les voies aériennes. Nos résultats suggèrent aussi que la persistance de l'éosinophilie sanguine et pulmonaire au cours du temps pourrait être responsable du maintien de l'HRB chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex.

## INTRODUCTION

### 1. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ASTHME

L'asthme est un syndrome respiratoire de type obstructif chronique caractérisé par l'apparition d'une dyspnée sibilante et d'une hyperréactivité bronchique (HRB) à divers stimuli. Cette HRB se traduit, le plus souvent, par une diminution du calibre des bronches et des bronchioles conduisant à une obstruction des voies aériennes qui est inhibée soit spontanément soit après utilisation de bronchodilatateurs.

Les différentes manifestations physiopathologiques associées à l'asthme sont un bronchospasme, un œdème de la paroi bronchique, une hypersécrétion de mucus, une hyperplasie des cellules du muscle lisse bronchique, un épaissement de la membrane basale bronchique, une hyperplasie des glandes de la muqueuse bronchique et une infiltration permanente des voies aériennes par des cellules inflammatoires (éosinophiles en particulier) (DUNNILL et coll., 1969). Depuis quelques années, un grand nombre de travaux cliniques et plus fondamentaux mettent en évidence la présence d'un état inflammatoire au niveau pulmonaire chez le sujet asthmatique. Cette participation potentielle des mécanismes inflammatoires dans la pathologie asthmatique suggère que l'asthme pourrait être un désordre inflammatoire de type subaigu et/ou chronique (BARNES, 1989). Chez les sujets asthmatiques, la sévérité de l'HRB semble souvent reliée à l'intensité de la réaction inflammatoire (DE MONCHY et coll., 1986; DJUKANOVIC et coll., 1990). Cependant,



l'implication directe des mécanismes inflammatoires dans le développement, le maintien ainsi que la chronicité du phénomène d'HRB chez le sujet asthmatique reste encore à démontrer.

La complexité de la pathogénèse de l'asthme provient sans aucun doute de la multiplicité des événements intervenant dans cette pathologie et des diverses interactions existant probablement entre les différents inflammatoires. Nous décrirons dans ce chapitre les principales modifications physiopathologiques impliquées dans l'asthme et leurs participations éventuelles dans le développement, le maintien et la chronicité de l'HRB puisque ce phénomène fait l'objet du présent travail de recherche.

## **2. L'HYPERREACTIVITE BRONCHIQUE**

### **2.1 Définition**

L'HRB ou hyperexcitabilité bronchique peut être définie comme un état de réactivité anormale (exagérée) de l'arbre trachéobronchique à un grand nombre de stimuli (BOUSHEY et coll., 1980; HARGREAVE et coll., 1986). L'HRB peut être classée en deux groupes distincts suivant la nature ou l'étiologie de l'asthme. L'HRB de type non-spécifique ou non-allergénique est une réactivité exagérée des voies aériennes à diverses substances comme les spasmogènes, les gaz irritants, l'air froid, l'exercice et les solutions saline hyper- ou hypo-osmolaires (HARGREAVE et coll., 1986). Cependant, le terme de "non-spécifique" attribué à ce type

d'HRB ne traduit pas l'absence de spécificité dans l'action du stimulus mais il signifie que tous les sujets asthmatiques, indépendamment de la nature de leur asthme, vont réagir à ce type de stimulus. L'HRB de type allergénique ou spécifique est mise en évidence après l'inhalation de l'allergène ou de l'agent allergisant (tel l'isocyanate de toluène) par les sujets sensibilisés (HARGREAVE et coll., 1986). Dans ces deux types d'HRB, la première réponse des voies aériennes après exposition au stimulus est une bronchoconstriction aiguë.

## **2.2 Mesure de l'HRB**

L'HRB est généralement mis en évidence chez le sujet asthmatique ou chez l'animal de laboratoire lors de tests de réactivité bronchique par la mesure de la résistance (ou de la conductance) des voies aériennes et des débits expiratoires maximaux (INGRAM, 1991). L'obstruction bronchique peut être provoquée par des stimuli de type direct ou indirect (HARGREAVE et coll., 1986). Les stimuli de type direct regroupent des substances comme l'acétylcholine et ses dérivés, l'histamine, les leucotriènes, certains prostanoïdes et le facteur d'activation des plaquettes (PAF; "Platelet Activating Factor"). Ces médiateurs agissent en se liant à leurs récepteurs respectifs présents sur le muscle lisse des voies aériennes et induisent la bronchoconstriction. Le groupe des stimuli de type indirect correspond principalement à l'inhalation d'aérosols de "5' monophosphate adénosine", d'antagonistes  $\beta_2$  adrénergiques ou de solution saline hyper- ou hypo-osmolaire. Ces stimuli indirects semblent provoquer la bronchoconstriction en agissant localement sur certaines

populations cellulaires des voies aériennes (mastocytes ou autres cellules inflammatoires) qui en retour libèrent des substances bronchoconstrictrices similaires aux stimuli de type direct préalablement décrits (WOOLCOCK, 1991). Dans le cas de l'inhalation d'antagonistes  $\beta_2$  adrénergiques, la bronchoconstriction n'est observée que chez le sujet asthmatique et semble associée à une inhibition du système sympathique adrénergique lequel contrôle la bronchoconstriction médiée par le système parasympathique cholinergique (WOOLCOCK, 1991). Il est intéressant de noter que les stimuli de type indirect ne provoquent pas ou peu d'obstruction bronchique chez le sujet sain à l'opposé de celle provoquée chez le patient asthmatique. Dans le cas de l'HRB décrite chez le patient avec une bronchite chronique, la réactivité des voies aériennes ne peut être mise en évidence avec les stimuli de type indirect (RAMSDALE, 1984) ce qui suggère que la nature ou l'étiologie de l'HRB peut être différente suivant le type de syndrome respiratoire étudié.

L'HRB peut être aussi étudiée lors d'expériences de réactivité bronchique *ex vivo* (essais biologiques). La détermination de l'HRB *ex vivo* consiste, après isolation de voies aériennes obtenues de différents niveaux de l'arbre trachéobronchique (trachée, bronche principale et inférieure, et parenchyme pulmonaire), de mesurer leur réactivité à divers agents contractiles et de la comparer à celle d'un groupe témoin (OREHEK et coll., 1977; DE JONGSTE et coll., 1987). Cette technique permet d'évaluer directement la réactivité du muscle lisse à différents niveaux de l'arbre trachéobronchique et de localiser la présence d'une altération sélective dans la réactivité des voies aériennes.

Lors des expériences de mesure de la réactivité bronchique *in vivo* ou *ex vivo*, des courbes dose-réponses ou concentration-réponses à un agent contractile sont réalisées et renseignent sur l'état de la réactivité des voies aériennes. Ces courbes permettent de déterminer divers paramètres comme la valeur de la concentration ou de la dose seuil de l'agoniste contractile, la valeur de la pente de la courbe dose- ou concentration-réponse (partie linéaire de la courbe) et la valeur de la contraction maximale (expériences *ex vivo*) ou de la bronchoconstriction maximale (peu souvent atteinte chez les sujets asthmatiques). La détermination d'un ou de plusieurs de ces paramètres permet de conclure quant à la présence d'une réactivité exagérée des voies aériennes après comparaison avec les valeurs mesurées chez le groupe témoin. Dans le cas des expériences *ex vivo* une augmentation de la valeur pente de la courbe et de la contraction maximale signifiera un changement intrinsèque au muscle lisse (modification du couplage excitation-contraction); ce type de changement est nommé changement "post-jonctionnel" (BOUSHEY et coll., 1980). Les modifications du couplage excitation-contraction telle que l'augmentation de l'activité ATPasique du complexe actomyosine (voir paragraphe 3.3) pourrait induire une augmentation de la contraction maximale du tissu. Lorsqu'un déplacement parallèle de la courbe vers la gauche est observé (sans changement de la valeur de la pente ou de la contraction maximale), cette modification de la réactivité bronchique est nommé changement "pré-jonctionnel" et ne semble pas associé *ex vivo* à une altération de la réponse du muscle lisse mais plutôt à une "hypersensibilisation" (ou "hyper-stimulation") des neurones pré-jonctionnels (BOUSHEY et coll., 1980). L'"hypersensibilisation" ou le "priming" des neurones pré-

jonctionnels serait un mécanisme qui augmenterait la contraction du tissu à un agoniste contractile à cause, par exemple, de la libération simultanée d'acétylcholine par les neurones cholinergiques pré-stimulés. Jacques et coll. (1992) ont montré que le pré-traitement *ex vivo* de la trachée de cobaye avec le leucotriène E<sub>4</sub> induit une hyperréactivité à l'histamine qui se traduit par un déplacement de la courbe concentration-réponse vers la gauche. Les auteurs proposent que le thromboxane A<sub>2</sub> (produit suite à la liaison du leucotriène E<sub>4</sub> sur son récepteur) induit un "priming" des neurones cholinergiques qui résulte en la libération endogène d'acétylcholine et augmente ainsi la contraction médiée par l'histamine. La conséquence d'une libération simultanée d'acétylcholine par les neurones cholinergiques est une augmentation de la contraction médiée par de plus faibles doses d'histamine (bloquée par l'atropine) qui se traduit par un déplacement parallèle de la courbe concentration-réponse vers la gauche (JACQUES et coll., 1992).

### **2.3 Étiologie de l'HRB**

L'étiologie de l'HRB n'est toujours pas élucidée même si plusieurs travaux suggèrent qu'elle soit dépendante de la nature de l'asthme (existence d'une prédisposition à l'allergie). L'HRB peut être induite chez l'homme (patient atopique asymptomatique ou non-atopique) et chez l'animal de laboratoire par des stimuli allergéniques (allergènes environnementaux, isocyanate de toluène...) ou non-allergéniques (gaz irritants, virus, médiateurs inflammatoires...). Dans le cas de l'HRB spécifique, il semble qu'il existe chez ces individus une prédisposition

génétique à réagir vis-à-vis d'un allergène donné (BURROWS et coll., 1989; GRAINGER et coll., 1990; PEPYS, 1994). Cette prédisposition se traduit, en particulier, par la présence dans le sang de ces individus d'IgE produites en réponse à l'exposition quotidienne à des allergènes communs à l'environnement de tous les individus (atopiques et non-atopiques). L'atopie semble donc associée à la présence de l'HRB (SEARS et coll., 1991; PEPYS, 1994). Les deux tiers des individus identifiés comme asthmatiques sont des sujets atopiques (réaction cutanée positive suite à l'injection intradermale de l'allergène); un certain nombre de ces individus atopiques resteront des sujets asymptomatiques (PEPYS, 1994). Cependant, la relation entre l'atopie et la présence de l'HRB reste controversée puisque l'établissement d'une corrélation entre ces deux phénomènes dépend du test clinique utilisé pour définir l'atopie (concentration plasmatique d'IgE ou réaction cutanée) (GRAINGER et coll., 1990).

Les sujets asthmatiques présentant une HRB de type spécifique et non-spécifique ont au moins un point en commun qui est la présence d'un état inflammatoire au niveau des voies aériennes. Cependant, la participation de l'inflammation des voies aériennes dans les altérations anatomiques et fonctionnelles reportées dans l'HRB de type spécifique et non-spécifique reste encore à être démontrée. Nous décrirons dans la suite de ce chapitre les principaux facteurs potentiellement impliqués dans le développement et/ou le maintien de l'HRB.

### **3. FACTEURS POTENTIELLEMENT RESPONSABLES DE L'HRB**

#### **3.1 Altérations du système nerveux autonome**

Plusieurs théories ou hypothèses sont émises pour essayer d'expliquer la ou les cause (s) initiale (s) du développement de l'HRB. Parmi ces théories, la possibilité d'une altération du système nerveux autonome contrôlant les fonctions du muscle lisse bronchique est proposée (HARGEAVE et coll., 1986 pour revue). Dans ce cas, l'HRB pourrait être attribuée à une augmentation de l'action des systèmes excitateurs (systèmes responsables de la contraction du muscle lisse) de type cholinergique,  $\alpha$ -adrénergique et non-cholinergique non-adrénergique (NANC) (BARNES et coll., 1986a pour revue). L'HRB pourrait aussi être attribuée à une altération des systèmes inhibiteurs (systèmes de rétro-contrôles du système excitateur) de type  $\beta$ -adrénergique (hypothèse de Szentivanyi's) et NANC inhibiteur (SVEDMYR, 1984; BARNES et coll., 1986a pour revues). Cependant, il semble que peu d'éléments sont en faveur d'une altération du système nerveux autonome comme cause initiale de l'HRB chez le sujet asthmatique puisque: 1) chez les sujets asthmatiques avec une HRB persistante, le traitement à l'atropine ne diminue pas l'état d'hyperréactivité (CASTERLINE et coll., 1976), 2) les antagonistes muscariniques ne bloquent pas la réactivité exagérée à l'histamine initialement induite par l'exposition du sujet asthmatique à l'allergène (BOULET et coll., 1984), 3) les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques ne semblent pas impliqués dans la génèse de l'HRB chez le sujet asthmatique; ces récepteurs semblent aussi posséder un rôle mineur dans

le maintient ou le changement du tonus et\ou du calibre des voies aériennes (BARNES et coll., 1981; THOMSON et coll., 1982) et 4) le blocage du système  $\beta$ -adrénergique par le propranolol (après inhibition de la réponse cholinergique par l'atropine) n'affecte pas la réactivité bronchique chez le sujet asthmatique (THOMSON et coll., 1982). Récemment, BARNES (1986b) a proposé que le mécanisme de réflexe axonale impliquant l'activation du système NANC excitateur (stimulation des fibres C sensibles et libération principalement de substance P et neurokinine A) par divers médiateurs inflammatoires (bradykinine, éicosanoïdes, ...) pourrait être responsable de la bronchoconstriction, de l'hypersécrétion de mucus et de l'œdème des voies aériennes chez les sujets asthmatiques; ces divers événements pourraient conduire par la suite au développement de l'HRB. Le réflexe axonale pourrait effectivement constituer un mécanisme important dans la pathogénèse de l'HRB puisque ce phénomène implique la participation de médiateurs pro-inflammatoires (BARNES et coll., 1987).

### **3.2 Épithélium bronchique**

La desquamation de l'épithélium bronchique est aussi un événement observée de la pathologie de l'asthme. Ce phénomène est observé chez les sujets avec un asthme sévère (DUNNILL, 1960; NAYLOR, 1962) ou modéré (JEFFERY et coll, 1989) même si certaines études relatent l'absence d'un endommagement de l'épithélium bronchique chez les patients diagnostiqués avec un asthme modéré (LOZEWICZ et coll., 1990).



Cependant, ces différents groupes de sujets asthmatiques présentent tous une HRB à la métacholine. Dans certains modèles animaux d'asthme expérimental, l'HRB est aussi présente malgré l'absence d'une desquamation de l'épithélium bronchique (GUNDEL et coll., 1990; OBATA coll., 1992). Chez certains sujets asthmatiques, le nombre de cellules épithéliales retrouvées dans le lavage bronchoalvéolaire (LBA) augmente et cette augmentation est corrélée à la présence de l'HRB (WARDLAW et coll., 1988; BEASLEY et coll., 1989). Dans des modèles *ex vivo*, l'élimination mécanique de l'épithélium bronchique augmente la réactivité bronchique aux spasmogènes mais réduit la réponse aux substances bronchorelaxantes (GOLDIE et coll., 1990; RAEBURN, 1990 pour revues). Ces phénomènes peuvent être attribués à l'absence de l'épithélium bronchique qui constitue une barrière physique à la diffusion des agents contractiles (ou allergènes) au niveau du muscle lisse bronchique. Ces effets peuvent aussi être liés à la perte des facteurs relaxants dérivés de l'épithélium bronchique comme le PGE<sub>2</sub> et le EpDRF ("Epithelium-Derived Relaxant factor") dont la nature chimique correspondrait au radical oxyde nitrique (ZAPOL et coll., 1994).

L'ensemble de ces travaux indique que l'épithélium bronchique joue un rôle important dans la régulation de la réactivité du muscle lisse bronchique. De plus, dans la pathologie de l'asthme, la cellule épithéliale apparaît comme une cellule cible exposée à divers médiateurs cytotoxiques et inflammatoires potentiellement responsables de l'altération fonctionnelle et/ou de la desquamation de l'épithélium bronchique. Cependant, divers travaux suggèrent que l'épithélium bronchique ne serait pas une cible

"innocente" mais qu'il participerait de manière active au processus inflammatoire présent au niveau des voies aériennes des sujets asthmatiques. Cette participation active de l'épithélium bronchique dans la réaction inflammatoire est suggérée par des travaux montrant que 1) les cellules épithéliales libèrent divers médiateurs inflammatoires comme les éicosanoïdes, l'endothéline, la substance P et diverses cytokines, 2) les cellules épithéliales expriment à leur surface des molécules d'adhésion favorisant la migration des cellules inflammatoires dans la lumière bronchique et 3) les cellules épithéliales expriment des antigènes de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (THOMPSON et coll., 1995 pour revue). Il est important de noter que l'expression des cytokines et des molécules d'adhésion est augmentée au niveau de l'épithélium bronchique des sujets asthmatiques (THOMPSON et coll., 1995). Le rôle précis des cellules épithéliales dans la modulation de l'inflammation et leur participation directe dans le développement de l'HRB reste encore à définir.

### **3.3 Muscle lisse bronchique**

La modification des éléments structuraux de la paroi bronchique (augmentation de la quantité de muscle lisse ou de l'épaisseur de la paroi bronchique, diminution de la circonférence bronchique ...) peut conduire à une altération de la réactivité intrinsèque du muscle lisse bronchique. Ces modifications de la paroi bronchique pourraient être une cause de l'augmentation de l'obstruction bronchique et de la présence de l'HRB chez le sujet asthmatique (MORENO et coll., 1986). Certaines études

suggèrent que la réactivité exagérée des voies aériennes chez le sujet asthmatique serait attribuable à des altérations du mécanisme de couplage excitation-contraction du muscle lisse. Chez le chien sensibilisé, le développement rapide de l'HRB s'accompagne de modifications moléculaires intrinsèques au muscle lisse bronchique telles que: 1) une augmentation de l'activité ATPasique du complexe actomyosine (KONG et coll., 1990), 2) une augmentation de la phosphorylation des chaînes légères de la myosine, lesquelles contrôlent l'activité ATPasique du complexe actomyosine (KONG et coll., 1990) et 3) une augmentation de la concentration totale de la kinase des chaînes légères de la myosine mais sans augmentation de l'activité intrinsèque de la kinase (JIANG et coll., 1992). Il reste à définir si ces modifications existent dans le muscle bronchique des sujets asthmatiques et si de telles altérations sont présentes lors de l'apparition de l'hypertrophie ou l'hyperplasie du muscle lisse; ces phénomènes se développent plus tardivement dans la pathologie de l'HRB chez le sujet asthmatique. Ces mécanismes cellulaires ne sont pas les seuls facteurs potentiellement responsables de l'augmentation de l'obstruction bronchique chez le sujet asthmatique. Dans le paragraphe suivant, nous allons voir que l'épaississement de la paroi bronchique causé par l'hyperplasie des cellules du muscle lisse, le dépôt de collagène ou la formation d'œdème pourrait aussi induire une réactivité exagérée des voies aériennes (JAMES et coll., 1989).

### **3.4 Perméabilité microvasculaire et œdème**

Dans les conditions physiologiques, l'homéostasie des fluides dans les différents compartiments tissulaires est maintenue principalement par deux forces opposées: la pression vasculaire hydrostatique (pression permettant au fluide de sortir du compartiment sanguin) et la pression oncotique transmurale générée par la concentration des protéines plasmatiques. Les études ultra-structurales des lits vasculaires systémiques chez les rongeurs ont permis de montrer que le site de l'extravasation plasmatique correspond essentiellement aux veinules post-capillaires. L'extravasation plasmatique des vaisseaux sanguins attribuable à des changements de la perméabilité de la membrane semble liée, en partie, à une contraction des cellules endothéliales (formation de "gap jonction") (RENKIN, 1992 pour revue). Cette contraction des cellules est médiée par divers médiateurs inflammatoires à action directe (histamine, leucotriènes, thromboxanes ...) (SIROIS et coll., 1988) ou à action indirecte (bradykinine) (EVANS et coll., 1988; ICHINOSE et BARNES, 1990) (Tableau I).

Le passage des protéines plasmatiques du milieu interstitiel vers la lumière des voies aériennes se fait, en partie, entre les cellules épithéliales (SIMANI et coll., 1974) même si l'existence d'un transport actif est envisageable (PRICE et coll., 1989). L'augmentation transitoire de l'extravasation plasmatique peut se dérouler sans changement morphologique de la structure de l'épithélium bronchique (ROGERS et coll., 1990). Cependant, d'autres travaux indiquent l'existence d'une

augmentation de l'espace intracellulaire entre les cellules épithéliales bronchiques ("epithelial tight dysjonction") (OHASHI et coll., 1992) ou entre les cellules basales de l'épithélium (SAETTA et coll., 1992) chez les sujets asthmatiques. L'augmentation des espaces intracellulaires pourrait favoriser ainsi le passage des protéines plasmatiques dans la lumière bronchique.

L'existence d'une augmentation de l'extravasation plasmatique et de la formation d'œdème dans la pathologie asthmatique est suggérée par les études histologiques des biopsies bronchiques, de l'analyse de l'expectorat et du contenu du LBA qui démontrent la présence d'une exudation des protéines plasmatiques de la microcirculation bronchique et la formation d'œdème tissulaire. L'expectorat (BROGAN et coll., 1975) et le LBA (LAM et coll., 1985) des sujets asthmatiques contiennent des quantités appréciables d'albumine sérique. La présence des protéines plasmatiques dans la lumière est un indicatif d'un changement de la perméabilité vasculaire et épithéliale (BROGAN et coll., 1975; LAM et coll., 1985). Chez les sujets décédés de crise d'asthme, l'œdème bronchique est très important (DUNNILL et coll., 1969). L'extravasation plasmatique et l'œdème subséquent provoquent un accroissement de l'épaisseur de la paroi bronchique qui est surtout associé à un épaississement de la sous-muqueuse (environ 70 % de l'augmentation de l'épaisseur de la paroi) (JAMES et coll., 1989). Ces derniers ont montré qu'en estimant à 10 % la contribution de l'œdème dans l'épaississement total de la paroi bronchique, il est possible de calculer l'effet de l'extravasation plasmatique sur la résistance des voies aériennes de petits calibres pour un

raccourcissement donné du muscle lisse bronchique. Ils ont montré que la résistance des voies aériennes chez le sujet asthmatique (mais non chez le sujet sain) augmente de manière exponentielle; ainsi le raccourcissement du muscle lisse nécessaire pour obstruer la lumière bronchique est beaucoup plus faible chez le sujet asthmatique en comparaison du sujet sain. Ces travaux suggèrent que l'extravasation plasmatique et la formation d'œdème dans la paroi bronchique peut conduire à une réactivité exagérée des voies aériennes même si le raccourcissement du muscle lisse se retrouve dans un intervalle physiologique. Le développement d'une HRB associée à la présence d'œdème dans la paroi bronchique n'est pas un événement exclusif à la pathologie de l'asthme puisqu'il est aussi observé dans le cas de la bronchite (FOLKERTS et coll., 1993). L'extravasation plasmatique et la formation d'œdème peuvent aussi avoir des conséquences sur l'hypersécrétion et la consistance du mucus (augmentation de sa viscosité) (WILLIAMS et coll., 1983; LIST et coll., 1978). L'augmentation de la viscosité du mucus recouvrant l'épithélium bronchique diminue son épuration (DUFANO et LUCK; 1982) et pourrait être un des facteurs responsables du décollement de l'épithélium bronchique chez le sujet asthmatique (DUNHILL, 1960). De plus, DUNHILL (1960) suggère que l'hypertrophie du muscle lisse serait un des mécanismes palliatifs employées par la paroi bronchique pour augmenter l'épuration des sécrétions par des contractions péristaltiques. L'ensemble de ces travaux indiquent que l'augmentation de l'extravasation plasmatique et l'œdème de la paroi bronchique sont des événements inflammatoires qui pourraient participer au développement de l'HRB; ce

qui suggère que l'inflammation pulmonaire serait une composante importante dans la pathogénèse de l'HRB.

### **3.5 Cellules et médiateurs inflammatoires**

Différents travaux de recherche ont permis d'identifier les populations cellulaires possiblement associées à la pathologie de l'HRB en fonction de leur localisation au niveau pulmonaire et des médiateurs préformés et néo-formés sécrétés par ces mêmes cellules. Dans ce chapitre, nous insisterons particulièrement sur les éosinophiles et leurs diverses caractéristiques biochimiques et fonctionnelles, ainsi que sur les évidences et les controverses face à leur implication potentielle dans l'HRB.

#### **3.5.1 Les mastocytes**

Les mastocytes retrouvés au niveau des voies aériennes se retrouvent en première ligne de cette longue chaîne d'activation cellulaire car ils possèdent des récepteurs de haute affinité pour les IgE produites en réponse au caractère antigénique de l'allergène. L'activation des mastocytes par l'allergène donne lieu à une réponse immédiate ("early asthmatic response") qui se traduit par la libération de médiateurs inflammatoires spécifiques de ces cellules comme l'histamine et la tryptase (BARNES et coll., 1988). Durant la phase tardive suivant l'exposition à l'allergène ("late asthmatic response"), les mastocytes activés peuvent aussi libérer deux facteurs chimotactiques spécifiques des

éosinophiles (ECF; "eosinophil chemotactic factor") et des neutrophiles (NCF; "neutrophil chemotactic factor") (METZGER et coll., 1986). L'histamine libérée par les mastocytes peut induire une bronchoconstriction, augmenter la perméabilité vasculaire, participer à la formation d'œdème, activer d'autres cellules inflammatoires environnantes et amplifier l'action des autres médiateurs inflammatoires (BARNES et coll., 1988) (Tableau I). Le nombre de mastocytes retrouvés dans la lumière des voies aériennes augmente chez le sujet asthmatique (WARDLAW et coll., 1988) mais cette augmentation est aussi observée dans d'autres pathologies pulmonaires dans lesquelles les autres symptômes de l'asthme tels que l'éosinophilie et l'obstruction bronchique ne sont pas présents (LAVIOLETTE et coll., 1991). L'étude des biopsies bronchiques de sujets sains et asthmatiques montrent que le nombre de mastocytes ne semble pas différent entre les sujets présentant un asthme modéré et les sujets normaux non-atopiques (BRADLEY et coll., 1991; DJUKANOVIC et coll., 1990). Cependant, la population de mastocytes dans la muqueuse bronchique augmente chez le sujet asthmatique après exposition à l'allergène et cette augmentation semble corrélée à la phase tardive de la réaction asthmatique (CRIMI et coll., 1991). Les quantités d'histamine et de tryptase retrouvées dans le LBA de sujets asthmatiques atopiques sont comparables à ceux des sujets non-asthmatiques atopiques (WENZEL et coll., 1988); les auteurs suggèrent ainsi que l'activation des mastocytes ne serait pas suffisante en elle-même pour induire l'HRB chez le sujet asthmatique. D'autres études semblent indiquer que l'augmentation de la réactivité bronchique à l'histamine proviendrait d'une libération au niveau présynaptique d'acétylcholine



Tableau I: Divers effets des médiateurs de l'inflammation

	BC	BD	CHE	MU	PV	VC	VD	HRB
<i>Peptide</i>								
Bradykinine	+	+	+	+	+	+	+	+
Substance P	+	-	+	+	+	+	+	+
Neurokinine A	+	-		+	+	+	+	+
VIP	-	+	-	-	+	-	+	-
<i>Lipides</i>								
LTC <sub>4</sub> , D <sub>4</sub> , E <sub>4</sub>	+	-	+	+	+	+	-	+
LTB <sub>4</sub>	+	-	+	-	+	+	-	+
PGE <sub>2</sub>	-	+	-	-	+	-	+	-
PGI <sub>2</sub>	-	+	-	-	-	-	+	-
PGF <sub>2α</sub>	+	-	-	+	+	+	+	+
TxA <sub>2</sub>	+	-	-	+	+	+	+	+
PAF	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Autres</i>								
Histamine	+	-	+	+	+	+	+	-
Sérotonine	+	-	-	-	+	+	+	ND

+: effet

-: pas d'effet

ND: non déterminé

BC: bronchoconstriction

BD: bronchodilatation

CHEM: chemotactisme

MU: sécrétion de mucus

VD: vasodilatation

VC: vasoconstriction

PV: perméabilité vasculaire

HRB: induction hyperréactivité bronchique

(TANAKA et coll., 1991) suggérant un rôle possible de l'histamine dans le développement de l'HRB. Cependant, les travaux de BOSQUET et coll. (1991) ont montré l'absence de corrélation entre ces deux phénomènes chez le sujet asthmatique. Malgré la participation des mastocytes dans la réponse immédiate suivant l'exposition à l'allergène chez le sujet asthmatique, l'implication des mastocytes dans le développement et la chronicité de l'HRB reste à encore à établir du fait de l'absence de l'efficacité des anti-histaminiques (anti-H1) dans le traitement de l'asthme et, en particulier, dans l'inhibition de l'HRB (BURKA, 1986).

### **3.5.2 Les monocytes-macrophages**

Plusieurs évidences suggèrent que les monocytes-macrophages pourraient aussi jouer un rôle dans la pathologie inflammatoire de l'asthme (WILKINSON et coll., 1989; LOHMANN-MATTHES et coll., 1994 pour revue): 1) les macrophages possèdent des récepteurs de faible affinité pour les IgE, 2) les monocytes-macrophages augmentent dans le LBA après exposition du sujet asthmatique à l'allergène et 3) certaines cytokines libérées par les macrophages alvéolaires (interleukine 1, "tumor necrosis factor" (TNF) et "granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)) augmentent les fonctions pro-inflammatoires des éosinophiles *in vitro* et peuvent être, comme dans le cas du GM-CSF, un facteur déterminant dans l'éosinopoïèse. Les macrophages libèrent aussi une autre cytokine le MIP-1 $\alpha$  ("Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$ ") (famille des chémokines) qui est un facteur chemotactique des éosinophiles (ROT et coll., 1992). Chez les sujets asthmatiques, le nombre de macrophages hypodenses est augmenté en comparaison des sujets

normaux (CHANEZ et coll., 1991). Cependant, le nombre de macrophages retrouvés dans les biopsies de sujets normaux et asthmatiques est peu différent et n'est pas corrélé à la sévérité de l'HRB (BRADLEY et coll., 1991). L'implication directe des macrophages et des monocytes dans le développement de l'HRB est difficile à démontrer puisque les médiateurs inflammatoires produits par ces cellules sont communs à plusieurs autres types cellulaires (cellules endothéliales, cellules épithéliales, granulocytes, lymphocytes...).

### **3.5.3 Les neutrophiles**

Les neutrophiles pourraient aussi participer au processus inflammatoire observé dans la pathologie de l'HRB car ces cellules peuvent libérer divers médiateurs inflammatoires comme les éicosanoïdes, le PAF et divers radicaux libres (HOGG, 1987). Les polymorphonucléaires neutrophiles sembleraient être impliqués dans le développement de l'HRB observée chez le patient sensibilisé et exposé à un aérosol d'isocyanate de toluène (FABBRI et coll., 1987). Cependant, certaines études relatent que l'infiltration des neutrophiles dans le poumon ne semble pas liée au développement de l'HRB chez le sujet asthmatique (WARDLAW et coll., 1988; LACOSTE et coll., 1993) et dans divers modèles animaux d'asthme expérimental (THOMPSON et coll., 1986; HUTSON et coll., 1990; GUNDEL et coll., 1992a). La participation des neutrophiles dans le développement de l'HRB reste encore à définir.

### 3.5.4 Les lymphocytes

Les résultats des études réalisées sur des biopsies de la muqueuse bronchique de sujets sains et asthmatiques semblent indiquer que le nombre de lymphocytes T de type CD4<sup>+</sup> (lymphocytes T auxiliaires ou "helper") et de type CD8<sup>+</sup> (lymphocytes T suppresseurs) est très similaire dans les deux groupes d'individus (BENTLEY et coll., 1992a). Cependant, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> retrouvés dans le LBA (WALKER et coll., 1991) et dans les biopsies bronchiques (BENTLEY et coll., 1992b) de sujets asthmatiques expriment pour la plupart le marqueur CD25<sup>+</sup> (récepteur de l'interleukine 2); ce qui suggère que ces cellules sont activées. Le nombre de lymphocytes T exprimant le phénotype CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> est corrélé au nombre d'éosinophiles et à l'intensité de l'HRB du sujet asthmatique (WALKER et coll., 1991). De plus, les concentrations sanguines du récepteur soluble de l'IL-2 augmentent chez les sujets asthmatiques symptomatiques en comparaison des sujets asthmatiques asymptomatiques et des sujets normaux (LASALLE et coll., 1992).

La participation potentielle des lymphocytes dans la régulation de l'éosinophilie bronchique est supportée par la capacité de ces cellules à pouvoir sécréter diverses cytokines telles les interleukines 3 et 5 (IL-3, IL-5) et le GM-CSF qui sont impliquées dans la prolifération, la maturation, la survie et l'activation des éosinophiles (CLUTTERBUCK et coll., 1990; SANDERSON, 1992 pour revue). L'hypothèse d'une implication des lymphocytes dans la pathologie de l'asthme est renforcée par les études d'hybridation *in situ* montrant l'expression importante d'ARN messenger

(ARNm) pour l'IL-5 dans les biopsies de la muqueuse bronchique provenant de sujets asthmatiques (HAMID et coll., 1991) et l'augmentation de la quantité de cette cytokine dans le LBA des sujets asthmatiques en comparaison des sujets sains (WALKER et coll., 1992). De plus, cette expression élevée d'ARNm pour l'IL-5 est corrélée au nombre d'éosinophiles activés et au degré de l'HRB déterminé chez ces sujets asthmatiques (HAMID et coll., 1991). Enfin, l'inhalation d'un aérosol d'IL-5 par le cobaye provoque une éosinophilie pulmonaire associée au développement de l'HRB chez cet animal (OOSTERHOUT et coll., 1993). Les lymphocytes T ne sont pas l'unique source cellulaire de production de ces cytokines puisque les mastocytes (BRADDING et coll., 1994) et les éosinophiles (BROIDE et coll., 1992) de sujets asthmatiques libèrent aussi diverses cytokines (en particulier l'IL-5) ce qui suggère déjà l'existence de mécanismes autocrines d'amplification de la réaction inflammatoire chez le sujet asthmatique. La libération d'autres cytokines comme l'IL-4 et l'IL-6 par les lymphocytes T de sujets asthmatiques (ROBINSON et coll., 1992) suggère que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> retrouvés chez le sujet asthmatique sont du type "helper" 2 (clone Th2). Les lymphocytes CD4<sup>+</sup> de type Th1 produisent essentiellement de l'IL-2 et de l'INF- $\gamma$  qui contrôlent négativement certains effets des cytokines produites par les lymphocytes Th2 (MOSSMAN et COFFMAN, 1987). Récemment, GAVETT et coll. (1994) ont montré que la déplétion des lymphocytes CD4<sup>+</sup> chez la souris sensibilisée à l'allergène prévient l'éosinophilie et l'HRB chez cet animal. La participation directe des lymphocytes T dans le développement de l'HRB reste encore à définir, cependant, ces cellules jouent probablement un rôle important dans le recrutement et l'activation des éosinophiles et

dans la modulation de la réaction inflammatoire présente dans les voies aériennes des sujets asthmatiques.

### 3.5.5 Les éosinophiles

Les éosinophiles sont des cellules jouant un rôle dans la défense de l'organisme contre certaines infections parasitaires (Helminthes) et contre la prolifération de cellules cancéreuses (GLEICH et coll., 1979; GLEICH, 1990 pour revues). Ce sont des cellules modulatrices de la réaction inflammatoire. Depuis plusieurs années, la présence des éosinophiles aux sites des réactions allergiques et dans certains syndromes pulmonaires a conduit les chercheurs à reconsidérer certaines de leurs caractéristiques physiopathologiques et d'entrevoir les éosinophiles comme des cellules effectrices de l'inflammation. Les éosinophiles semblent tenir un rôle important dans la physiopathologie de l'asthme du fait de leur présence dans les voies aériennes des sujets asthmatiques et de leur capacité à libérer un nombre considérable de médiateurs pro-inflammatoires et cytotoxiques. L'implication des éosinophiles dans le développement de l'HRB faisant l'objet du présent travail de recherche, nous insisterons dans ce chapitre sur les principales propriétés biologiques et biochimiques de ces cellules en relation avec leur migration et leur activation, ainsi que sur les diverses évidences suggérant leur implication dans le développement de l'HRB.

*Morphologie.* Les éosinophiles appartiennent à la famille des granulocytes au même titre que les neutrophiles et les basophiles. Les

éosinophiles sont caractérisés morphologiquement par un noyau bilobé et par la présence dans leur cytoplasme de différents types de granules de sécrétion dont le nombre dépend essentiellement de l'état de maturation de ces cellules (GLEICH, 1990) (Tableau II). Les constituants de ces divers granules sont des protéines avec ou sans activité enzymatique (Tableau III). Les éosinophiles contiennent des granules nommés secondaires dont la matrice est principalement composée par la MBP ("Major Basic Protein") et est entourée par d'autres protéines basiques ou cationiques comme la ECP ("Eosinophil Cationic Protein"), la EPO ("Eosinophil Peroxidase") et la EPX ou EDN ("Eosinophil Protein X" ou "Eosinophil-Derived Neurotoxin") (Tableau II).

*Récepteurs membranaires.* Les éosinophiles expriment à leur surface des récepteurs pour des médiateurs lipidiques (leucotriènes, PAF), des cytokines (IL-3, IL-5 et GM-CSF), des fragments du complément (C1q, C5a), des immunoglobulines (IgE et IgA) et des molécules d'adhésion (GLEICH et coll., 1993 pour revue). La liaison de ces diverses molécules sur leurs récepteurs respectifs à la surface des éosinophiles entraîne une activation de ces cellules qui se traduit le plus souvent par la libération de plusieurs médiateurs préformés et néo-formés.

*Médiateurs préformés.* Les éosinophiles contiennent un nombre important d'enzymes et de substances cytotoxiques stockées dans divers

Tableau II: Type de granules cytoplasmiques présents dans les éosinophiles selon le stade de maturation.

Types de granules	Stade de différenciation	Contenu du granule
Granule primaire	Promyelocyte	Cristal de Charcot-Leyden (lysophosphatase)
Granule secondaire	Éosinophile mature	Protéines basiques (MBP, ECP, EPX, EPO)  Hydrolases ( $\beta$ -glucuronidase, collagénase)
Petit granule	Éosinophile mature	Arylsulfatase B, phosphatase
Corps lipidiques	Éosinophile mature activé	Réserve d'acides gras insaturés

MBP: "Major Basic Protein" ECP: "Eosinophil Cationic Protein"

EPX: "Eosinophil Protein X" EPO: "Eosinophil Peroxidase"



granules de sécrétion et dont le rôle principal est la protection de l'organisme contre l'action de certains parasites et la dégradation de plusieurs molécules (Tableau III). Les protéines cationiques présentes dans les granules de sécrétion, en particulier la MBP, la ECP et la EPO, possèdent aussi des propriétés cytotoxiques vis-à-vis de l'épithélium bronchique (GLEICH et coll., 1979; MOTOJIMA et coll., 1989; ) ce qui suggère déjà une implication potentielle de ces protéines cationiques dans la génèse de l'HRB. Cependant, l'activité cytotoxique de la MBP est non-sélective puisqu'elle provoque une lyse aussi bien des cellules spléniques que des cellules intestinales (GLEICH et coll., 1979). La ECP et la EPO provoquent aussi une desquamation de l'épithélium bronchique (MOTOJIMA et coll., 1989). La MBP administrée chez le primate induit aussi une bronchoconstriction (GUNDEL et coll., 1991). Le rôle des cristaux de Charcot-Leyden crystal reste encore obscure, cependant, la dégradation du lysophosphatidylcholine (un composant important du surfactant pulmonaire) par ces cristaux suggère que cette substance pourrait être impliquée dans le développement de l'atélectasie observée chez le sujet asthmatique (GLEICH, 1990).

*Médiateurs néo-formés.* Les éosinophiles synthétisent divers métabolites oxygénés comme l'anion superoxide (TAUBER et coll., 1979), le radical hydroxyle (WEISS et coll., 1986) et le peroxyde d'hydrogène (KAZURA et coll., 1981) qui ont pour fonction de tuer les micro-organismes et les cellules tumorales (Tableau III). Ces cellules produisent aussi divers médiateurs lipidiques comme les prostaglandines (PG) E<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub>, le thromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), les leucotriènes (LT) B<sub>4</sub> et C<sub>4</sub> (HUBSCHER, 1975;

Tableau III: Principales activités biologiques des médiateurs préformés présents dans les éosinophiles

Protéines	Activités biologiques
<i>Protéines sans activité enzymatique</i>	
MBP	- cytotoxique (Helminthes, cellules normales...) - activation mastocytes (dégranulation)
ECP	- cytotoxique (Helminthes, cellules normales...) - activation mastocytes (dégranulation)
EPX ou EDN	- fortement neurotoxique
<i>Protéines avec activité enzymatique</i>	
EPO	- cytotoxique (Helminthes, cellules normales...) - activation mastocytes (dégranulation)
CLC	- dégradation du lysophosphatidylcholine
Collagénase	- hydrolyse le collagène de type I et II (matrice)
Arylsulfatase	- hydrolyse des protéoglycans et glycosaminoglycans
$\beta$ -glucuronidase	- hydrolyse des glycosides

MBP: "Major Basic Protein" ECP: "Eosinophil Cationic Protein"

EPX: "Eosinophil Protein X" EPO: "Eosinophil Peroxidase"

CLC: "Charcot-Leyden crystal"

BORGEAT et coll., 1984; HIRATA et coll., 1989 et 1990; KROEGEL et coll., 1994) ainsi que le PAF (LEE et coll., 1984). Les effets biologiques de ces médiateurs sont aussi divers que la vasodilatation, la bronchoconstriction, l'œdème, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'augmentation de la sécrétion de mucus et l'induction de l'HRB (BARNES et coll., 1988; Tableau I). Les éosinophiles activés libèrent aussi un composé lipidique désigné sous le nom de "Eosinophil Chemotatic Lipid" qui comme son nom l'indique est un facteur chemotactique des éosinophiles (SCHWENK et coll., 1992). Les éosinophiles synthétisent de l'IL-3, de l'IL-5 et du GM-CSF qui comme nous l'avons préalablement mentionné, sont des cytokines régulatrices de l'éosinopoïèse et de la fonction des éosinophiles. Ces cellules contiennent aussi de l'ARNm codant pour le "Transforming Growth Factor" (TGF) de type  $\alpha$  et  $\beta 1$  (OHNO et coll., 1992) qui peuvent inhiber la production de cytokines par les lymphocytes Th2. Enfin, les éosinophiles libèrent aussi des neuropeptides comme la substance P et le VIP ("Vasoactive Intestinal Peptide") (ALIAKBARI et coll., 1987) qui sont des substances pouvant moduler la réponse inflammatoire présente dans les voies aériennes (activation des mastocytes par la substance P) (Tableau I). Les éosinophiles en libérant l'ensemble de ces médiateurs auront ainsi la capacité de moduler la réponse immunitaire et d'amplifier la réaction inflammatoire dans le micro-environnement des voies aériennes des sujets asthmatiques.

*Hétérogénéité des éosinophiles.* Les différentes sous-populations d'éosinophiles peuvent être classées suivant leur aspect morphologique (dégranulation, apparition de nombreuses vacuoles), l'expression

hétérogène des marqueurs de surface en relation avec la pathologie (expression de l'antigène de surface HLA-DR par les éosinophiles de sujets avec une pneumonie) et la densité (d) des cellules (normodenses  $> d = 1.082 <$  hypodenses) (FUKUDA et GLEICH, 1985 pour revue). Chez l'homme, les éosinophiles normodenses constituent près de 90% du nombre total d'éosinophiles sanguins (FUKUDA et coll., 1985; FRICK et coll., 1989) alors que chez le sujet asthmatique les éosinophiles hypodenses constituent 35 à 65% de la population totale d'éosinophiles sanguins (FUKUDA et coll., 1985; FRICK et coll., 1989). Les éosinophiles retrouvés dans le LBA de sujets asthmatiques 48 heures après inhalation de l'allergène sont en grande proportion de types hypodenses (KROEGEL et coll., 1994). De plus, chez les sujets asthmatiques la réduction du nombre d'éosinophiles hypodenses sanguins observée suite au traitement avec les glucocorticoïdes, est corrélée à la réduction de l'HRB (KUO et coll., 1994). Il est intéressant de noter que plusieurs médiateurs inflammatoires (leucotriènes, PAF et cytokines) ont la propriété de transformer *in vitro* les éosinophiles normodenses en éosinophiles hypodenses (KAJITA et coll., 1985; YUKAWA et coll., 1989; ROTHENBERG et coll., 1989) ce qui se traduit le plus souvent par une dégranulation de ces cellules. L'importance de la présence d'éosinophiles hypodenses dans le sang et dans le LBA ne se limite pas à la simple conclusion d'une activation et d'une dégranulation probable de ces cellules. Les éosinophiles hypodenses répondent plus fortement à un même stimulus en comparaison des éosinophiles normodenses (PRIN et coll., 1983); ce qui suggère que la réponse inflammatoire médiée par les éosinophiles hypodenses est probablement plus importante. La détermination de la population

d'éosinophiles retrouvées dans le sang ou le LBA du sujet asthmatique pourrait être un indice de l'état d'activation de ces cellules et de leur participation potentielle dans la pathologie étudiée.

*Migration de éosinophiles.* La migration des éosinophiles de la circulation sanguine vers les tissus périphériques se produit selon des mécanismes communs à toute migration de cellules inflammatoires et peut se résumer en 7 étapes principales: 1) contact des éosinophiles avec les cellules endothéliales, 2) roulement des éosinophiles sur la paroi endothéliale, 3) adhésion réversible des éosinophiles sur les cellules endothéliales exprimant des molécules d'adhésion du type E- et P-sélectines, 4) induction de l'expression et/ou augmentation de l'affinité des intégrines présentes à la surface des éosinophiles par le facteur chimotactique et les médiateurs inflammatoires libérés par diverses cellules (cellules endothéliales, cellules épithéliales, cellules inflammatoires), 5) adhésion plus importante des éosinophiles via leurs intégrines à l'endothélium vasculaire par liaison avec les sélectines et intégrines présentes à sa surface, 6) migration trans-endothéliale des éosinophiles (diapédèse), 7) migration des éosinophiles dans la sous-muqueuse et la muqueuse des voies aériennes puis dans la lumière bronchique (CARLOS ET HARLAN, 1994; pour revue). Il existe plusieurs facteurs chimotactiques pour les éosinophiles qui peuvent être classés en deux groupes suivant leur sélectivité pour ces cellules. Le premier groupe inclut le PAF (WARDLAW et coll., 1986), le LTB<sub>4</sub> (MAGHNI et coll., 1991) et l'IL-8 (ERGER et coll., 1995) qui sont des facteurs chimotactiques à la fois pour les éosinophiles et les neutrophiles (BARNES et coll., 1988 pour

revue). Cependant, l'IL-2 (RAND et coll., 1991b), l'IL-4 (LUKACS et CASALE, 1994), l'IL-5 (WANG et coll., 1989), le LCF ("Lymphocyte chemoattractant factor") (RAND et coll., 1991a), ainsi que les trois chemokines nouvellement identifiées, le MIP-1 $\alpha$  (ROT et coll., 1992), le composé RANTES ("Regulated upon Activation in Normal T-cells Expressed and Secreted") (KAMEYOSHI et coll., 1992; ROT et coll., 1992) et l'éotaxine (JOSE et coll., 1994) sont des facteurs chemotactiques des éosinophiles (KAPLAN et coll., 1994 pour revue); l'IL-2 et le LCF sont aussi des facteurs chemotactiques des lymphocytes CD4<sup>+</sup> (RAND et coll., 1991a). L'existence de facteurs chemotactiques sélectifs pour les éosinophiles et les lymphocytes CD4<sup>+</sup> pourrait expliquer la migration sélective et conjointe de ces deux types de cellules dans les voies aériennes des sujets asthmatiques. L'importance des diverses étapes décrites pour le recrutement des éosinophiles aux sites inflammatoires est démontrée par divers travaux indiquant que l'inhibition de la synthèse ou de l'action de divers facteurs chemotactiques (LAITINEN et coll., 1991), ou l'administration d'anticorps anti-intégrines ou anti-sélectines (WEGNER et coll., 1990; GUNDEL et coll., 1992b) diminuent fortement l'éosinophilie pulmonaire et dans certains cas l'HRB. Cependant, chez le rat Brown-Norway les anticorps anti-intégrines ou anti-sélectines réduisent l'HRB sans altérer l'influx d'éosinophiles dans les poumons (SUN et coll., 1994; LABERGE et coll., 1995)

Les éosinophiles possèdent donc un arsenal important de médiateurs inflammatoires qui peuvent affecter les fonctions physiologiques des voies aériennes via des mécanismes de types non-

oxydatifs (protéines cationiques, médiateurs lipidiques, cytokines) et de types oxydatifs (radicaux libres). L'altération des fonctions physiologiques des voies aériennes par les éosinophiles pourrait alors conduire au développement de l'HRB.

*Implications des éosinophiles dans l'HRB.* L'éosinophilie est une caractéristique importante de la pathologie de l'asthme (GLEICH, 1990 pour revue). Plusieurs travaux de recherches suggèrent que les éosinophiles seraient impliqués dans la pathologie inflammatoire de l'asthme et de ce fait dans le développement de l'HRB:

- Des études histologiques montrent la présence d'un nombre important d'éosinophiles dans la muqueuse et la sous-muqueuse des bronches de sujets asthmatiques ne recevant pas de corticostéroïdes (DURHAM ET KAY, 1985).

- Chez les sujets asthmatiques exposés à l'allergène, l'analyse cellulaire sanguine et du LBA révèle que la population d'éosinophiles est augmentée lors de la réaction allergique retardée ("late asthmatic response") et que ces événements sont corrélés à l'augmentation de la réactivité bronchique à la métacholine (METZGER et coll., 1986; KIRBY et coll., 1987; TAYLOR ET LUKSZA, 1987; WARDLAW et coll., 1988; BRUSASCO et coll., 1990; WALKER et coll., 1991; OLIVIERI et FORESI, 1992; LACOSTE et coll., 1993).

- Chez les sujets asthmatiques, le nombre d'éosinophiles hypodenses est augmenté (FUKUDA et coll., 1985) et leur nombre semble associé à la sévérité de l'HRB (CALHOUN et coll., 1992; KUO et coll., 1994).

- Chez le primate sensibilisé, l'inhalation de l'allergène provoque une augmentation du nombre d'éosinophiles et de la réactivité des voies aériennes; le nombre d'éosinophiles et les quantités de MBP retrouvées dans le LBA sont corrélés au degré de L'HRB (GUNDEL et coll., 1990).

- Chez le primate sensibilisé, l'éosinophilie pulmonaire et l'HRB observées après l'exposition chronique à l'allergène sont atténuées après traitement avec des anticorps anti-ICAM-1 (WEGNER et coll., 1990)

- Chez le cobaye sensibilisé à l'ovalbumine, le nombre d'éosinophiles retrouvés dans la muqueuse et la sous-muqueuse des voies aériennes et dans le LBA (IIJIMA et coll., 1987; HUTSON et coll., 1988; ISHIDA et coll., 1989; BOICHOT et coll., 1991) est corrélé à l'augmentation de la réactivité bronchique à la métacholine.

- Chez les humains asthmatiques décédés d'une crise d'asthme, les études immunohistologiques révèlent une localisation importante de MBP au niveau de la sous-muqueuse des bronches et bronchioles en association avec une desquamation marquée de l'épithélium bronchique (FILLEEY et coll, 1982).

- Les concentrations des protéines cationiques retrouvées dans le sang ou le LBA sont augmentées chez le sujet asthmatique et sont positivement corrélées à la sévérité de l'HRB (WARDLAW et coll., 1988; GRIFFIN et coll., 1991; LACOSTE et coll., 1993).

- L'instillation intratrachéale de MBP augmente la réactivité bronchique à la métacholine chez le primate (GUNDEL et coll., 1991) et chez le rat (UCHIDA et coll., 1993); cet effet est mimé par les polypeptides basiques (poly-L-lysine et poly-L-arginine) et est bloqué par l'héparine



(COYLE et coll., 1993) et les polypeptides anioniques (BARKER et coll., 1991).

- L'instillation intratrachéale de MBP chez le cobaye augmente la résistance des voies aériennes et potentie l'effet de divers bronchoconstricteurs (DESAI et coll., 1993).

- L'application *ex vivo* de la MBP dans la lumière de la trachée (FLAVAHAN et coll., 1988) ou l'injection de la MBP dans la sous-muqueuse de la trachée induit une augmentation de la réactivité bronchique à l'acétylcholine et l'histamine (BROFMAN et coll., 1989; WHITE et coll., 1990).

- La MBP et la EPO semblent être des antagonistes allostériques sélectifs des récepteurs M<sub>2</sub> muscariniques (autorécepteurs présents sur les terminaisons nerveuses pré-synaptiques cholinergiques contrôlant négativement la libération d'acétylcholine) (JACOBY et coll., 1993) dont l'inhibition "continue" pourrait être une des causes de l'état d'HRB (FRYER ET JACOBY, 1992; ELBON et coll., 1995).

La contribution potentielle des éosinophiles dans l'inflammation des voies aériennes et dans le développement de l'HRB est aussi suggérée par les études montrant que la MBP peut affecter les fonctions physiologiques de l'épithélium bronchique. La MBP diminue le nombre de battement des cils des cellules épithéliales ciliées des voies aériennes (HASTIE et coll., 1987). L'instillation *ex vivo* de la MBP dans la muqueuse bronchique réduit le transport ionique par les cellules épithéliales (JACOBY et coll., 1988) ce qui se traduit le plus souvent par une modification du transport d'eau par la barrière épithéliale et par une augmentation de la sécrétion de mucus

(BOUCHER, 1994 pour revue). L'augmentation de la sécrétion de mucus favorise l'installation de la réaction inflammatoire dans la lumière des voies aériennes (KONIETZKO, 1986) et peut provoquer une obstruction bronchique qui peut participer au développement de l'HRB. Malgré l'ensemble de ces données justifiant un rôle potentiel des éosinophiles et de ses divers médiateurs inflammatoires et cytotoxiques dans le développement de l'HRB, d'autres données de la littérature suggèrent que les éosinophiles ne sembleraient pas jouer un rôle majeur dans la pathogénèse de l'asthme et de ce fait que l'éosinophilie observée chez le sujet asthmatique serait plus une conséquence qu'une cause de l'état asthmatique.

*Controverses.* Plusieurs travaux de recherches suggèrent aussi que l'influx d'éosinophiles dans les poumons ne provoque pas ou n'est pas associé avec le développement de l'HRB:

- Chez certains sujets asthmatiques, il n'existe pas de corrélation entre le nombre d'éosinophiles présents dans le LBA ou infiltrant la muqueuse des bronches et l'intensité de l'HRB (ADELROTH et coll., 1990; DJUKANOVIC et coll., 1990; SMITH, 1992 pour revue).

- Chez les sujets asthmatiques asymptomatiques (stabilisation de l'état asthmatique) , il n'existe pas de corrélation entre le nombre d'éosinophiles présents dans le LBA et la réactivité des voies aériennes (BRUSASCO et coll., 1990).

- Chez certains sujets asthmatiques, il n'existe pas de corrélation entre le nombre d'éosinophiles sanguins et la sévérité de l'HRB (ALFARO et coll., 1989).

- Chez certains sujets asthmatiques morts à la suite d'une crise d'asthme, la desquamation de l'épithélium bronchique est observée en l'absence d'une infiltration d'éosinophiles ou de dépôt de matériel immunoréactif à la MBP dans la sous-muqueuse (GLEICH et coll., 1987).

- Dans divers syndromes pulmonaires à éosinophilie (pneumonie et bronchite chronique à éosinophiles, mycose bronchopulmonaire allergique, syndrome de Loeffler, syndrome d'hyperéosinophilie ...) les patients ne présentent généralement pas d'HRB ou seulement de manière transitoire. Le traitement avec les glucocorticoïdes est généralement suffisant pour obtenir une rémission quasi totale des symptômes (ENRIGHT et coll., 1989; GIBSON et coll., 1989).

- Chez le cobaye sensibilisé à l'ovalbumine l'influx d'éosinophiles dans le poumon ne provoque pas d'HRB (CHAPMAN et coll., 1991; WATSON et coll., 1992; HUEUER et coll., 1994) et dans le cas où ces deux phénomènes sont observés simultanément, la diminution de la migration de ces cellules par des anti-inflammatoires ne réduit pas pour autant l'état d'hyperréactivité (SANJAR et coll., 1990).

- Chez le rat Brown-Norway sensibilisé, l'administration d'anticorps anti-intégrines (LABERGE et coll., 1995) ou anti-sélectines (SUN et coll., 1994) inhibe l'HRB alors que l'influx d'éosinophiles dans le poumon n'est pas toujours affecté.

Dans le cas du cobaye sensibilisé et exposé à l'ovalbumine, les différences dans le protocole de sensibilisation à l'ovalbumine (dose d'antigène, répétition de l'exposition à l'allergène, addition d'adjuvants ...) pourraient être à l'origine de cette controverse sur la relation entre l'éosinophilie et l'HRB dans ce modèle animal (CHAND et coll., 1992; HOWELL et coll., 1992).

L'ensemble des travaux *in vivo* montrant l'implication potentielle de l'éosinophilie dans la pathogénèse de l'HRB chez le sujet asthmatique est basé sur l'existence d'une corrélation entre ces deux phénomènes. Cependant, la présence d'une corrélation ne signifie pas pour autant l'existence d'une relation de cause à effet. Dans le cas des travaux suggérant que les éosinophiles ne semblent pas impliqués dans la pathogénèse de l'HRB, il est important de noter que dans la plupart de ces études l'influx d'éosinophiles fut mesuré dans le LBA et que l'activation potentielle des éosinophiles n'a pas été évaluée. Ces diverses études soulèvent la question de la pertinence de la détermination du nombre d'éosinophiles dans le LBA comme paramètre d'évaluation du degré de l'éosinophilie et de l'évaluation de l'état inflammatoire des poumons chez le sujet asthmatique (MICHEL et coll., 1989). Il en serait de même pour la détermination du nombre d'éosinophiles sanguins puisque certains auteurs montrent que le degré d'éosinophilie dans l'expectorat du sujet asthmatique retranscrit mieux l'importance potentielle des éosinophiles dans la sévérité de l'HRB (ALFARO et coll., 1989).

#### 4 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Suite à l'analyse de la littérature il est difficile de définir lequel des évènements inflammatoires prédomine sur les autres pour provoquer l'HRB et plus particulièrement quelles sont les interactions entre ces divers évènements car la plupart des mécanismes rapportés sont étudiés chez des groupes de sujets dont l'étiologie et la sévérité de l'asthme ne sont pas semblables. De plus, divers paramètres comme l'âge, le sexe (femmes enceintes) et la thérapie passée et présente administrée aux sujets asthmatiques sont autant de facteurs qui peuvent influencer la sévérité de l'état asthmatique et conduire à des conclusions opposées ou controversées. Chez l'animal, la difficulté d'associer et de comprendre les divers évènements inflammatoires impliqués possiblement dans la pathologie de l'HRB est attribuable au fait que les données proviennent de divers modèles animaux d'asthme expérimental; chacun de ces modèles expérimentaux est unique par son propre protocole de sensibilisation (KAROL, 1994 pour revue). Il est alors difficile d'expliquer les mécanismes de l'HRB en utilisant les données de modèles expérimentaux différents. Il devient donc important de définir la relation temporelle entre les différents évènements inflammatoires *dans un même modèle expérimental*. Dans le cas des études sur les éosinophiles, l'ensemble des données de la littérature ne remettent pas pour autant en question la participation de ces cellules dans la pathologie inflammatoire de l'asthme. Ces études indiquent que les différents mécanismes conduisant à l'HRB, et dans lesquels les éosinophiles participent probablement pour une part, sont des

événements dont "l'ordre chronologique" et les interactions restent encore mal définis.

Le but du présent projet de recherche est d'étudier la participation potentielle de divers événements inflammatoires dans le développement et le maintien de l'HRB en utilisant **le même modèle animal**. Nous avons choisi comme modèle animal le cobaye injecté aux billes de Sephadex (de type G-50 Superfine) car nous avons récemment montré que cette injection induit rapidement un recrutement important d'éosinophiles et de neutrophiles dans les poumons (MAGHNI et coll., 1991). De plus, les expériences préliminaires réalisées *ex vivo* sur la réactivité des voies aériennes indiquent que cette même injection induit une HRB chez cet animal (MAGHNI et coll., 1992). Les objectifs de cette étude sont donc de déterminer dans ce modèle d'inflammation pulmonaire chez le cobaye:

1- Si l'HRB précède l'éosinophilie ou est causée par l'infiltration des éosinophiles ou d'autres cellules inflammatoires dans le poumon.

2- Si la présence de l'HRB déterminée *ex vivo* à divers niveaux de l'arbre trachéobronchique est associée avec l'infiltration des éosinophiles dans ces mêmes tissus.

3- Si l'activation des éosinophiles et la libération subséquente des protéines cationiques sont associées au déclenchement et/ou au maintien de l'HRB.

4- Déterminer les autres évènements inflammatoires présents chez le cobaye injecté aux billes de sephadex et définir leur implication dans le développement de l'HRB.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **1 INDUCTION DE L'INFLAMMATION PULMONAIRE CHEZ LE COBAYE**

#### **1.1 Injection des billes de Sephadex**

L'induction d'une inflammation pulmonaire suite à l'injection des billes de Sephadex a été initialement décrite chez le rat par WALLS et BENSON (1972). Sur la base de cette étude, des cobayes Dunkin Hartley (250 - 300 g) provenant de la compagnie Charles River (Saint-Constant, Canada) ont été injectés avec divers types de billes de Sephadex (Superfine; Pharmacia, Uppsala, Suède) resuspendues dans de la saline isotonique, stérile et apyrogène immédiatement avant l'injection. Les billes de Sephadex ont été injectées chez le cobaye conscient via une veine de l'oreille (anesthésie locale avec une solution de xylocaine 2 %). Nous avons aussi étudié l'effet de l'injection de divers type de billes de Sephadex sur l'infiltration de cellules inflammatoires dans les poumons de cobaye. Dans ce cas, l'injection intraveineuse de 0.42 ml/kg d'une suspension de billes de Sephadex G-50 (24 mg/kg), G-75 (14.27 mg/kg), G-100 (8.0 mg/kg) et G-200 (10.71 mg/kg) a été réalisée chez le cobaye conscient. Dans une deuxième série d'expériences, diverses doses de Sephadex G-50 (9.86, 3.86, 1.29 et 0.43 mg/kg) ont été administrées chez le cobaye conscient afin de déterminer l'intensité de la réaction inflammatoire suivant la dose de billes injectées chez l'animal.



## **1.2 Mesure de l'influx de cellules inflammatoires**

### **1.2.1 Énumération des éosinophiles sanguins**

Après sacrifice de l'animal, le sang a été prélevé par ponction cardiaque et récupéré dans une seringue contenant une solution de citrate de sodium 3.15 % (1 ml de citrate de sodium pour 9 ml de sang). Les cellules sanguines (2 ml de sang récupéré) ont été suspendues dans 8 ml de tampon phosphate salin (10 ml d'une solution concentrée (g/L): KCl 0.2,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.15, et de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 diluée dans 900 ml de saline 0.9 % et 90 ml d'eau stérile; pH 7.4). Les leucocytes ont été séparés des érythrocytes par centrifugation sur un gradient de Percoll continu de 67.5 %. La solution de Percoll a été préparée en mélangeant préalablement une solution commerciale de Percoll (Sigma Chemicals Inc., St-Louis, MO) avec une solution contenant 0.9 g de NaCl dissout dans 10 ml de tampon phosphate salin 10 fois concentré (composition décrite ci-dessus) dans des proportions respectives de 27.74:2.26 (v/v). Cette solution de Percoll nommée 100 % a été ensuite diluée avec du tampon phosphate salin de manière à obtenir la concentration de Percoll adéquate. Après création du gradient continu par centrifugation du mélange à 67.5 % de Percoll (20 000 g, 15 min, 4 °C) la préparation de cellules sanguines (10 ml) a été déposée sur ce gradient et centrifugée (360 g, 30 min, 20 °C). Les cellules sanguines récupérées dans le haut et dans la phase intermédiaire du gradient de Percoll (les érythrocytes se retrouvant dans le bas du gradient) ont été lavées avec du tampon phosphate salin (10 ml) puis après centrifugation les leucocytes ont été resuspendus dans 2 ml de tampon phosphate salin. Le nombre de

cellules a été déterminé à l'aide d'un hématimètre de Neubauer et la viabilité a été mesurée par le test d'exclusion du bleu de Trypan. Le nombre de leucocytes sanguins contenu dans 1 mm<sup>3</sup> de sang a été calculé selon:

$$\text{Nombre de leucocytes} = \{(N \times V) / 2 \times (V-1)\} / 1000 \text{ (équation 1)}$$

(cellules / mm<sup>3</sup> de sang)

avec V: volume de sang collecté incluant le citrate de sodium  
 V-1: volume de sang réellement collecté après soustraction du volume de citrate (1 ml)  
 2: 2 ml de sang pris du volume V et déposés après dilution sur le gradient de Percoll continu  
 N: nombre de leucocytes sanguins ( $\times 10^6$  cellules) présents dans les 2 ml de sang dilué et mesurés dans les quatre chambres de l'hématimètre selon:

$$N = 3000 \times C \times V_s \times D \text{ (équation 2)}$$

avec 3000: facteur constant tenant compte de la dimension des chambres de l'hématimètre, du volume de la suspension cellulaire (100 µl) et du volume de la solution de bleu de Trypan (20 µl)  
 C: nombre de cellules comptées dans les quatre chambres de l'hématimètre  
 Vs: volume de suspension des leucocytes

#### D: facteur de dilution de la suspension cellulaire

Le nombre d'éosinophiles sanguins est déterminé sur des préparations cytologiques de leucocytes totaux sanguins par coloration au Wright (préparations cytologiques incubées pendant 3 min avec le colorant et lavées avec de l'eau distillée).

#### **1.2.2 Populations cellulaires du liquide du lavage bronchoalvéolaire**

La présence de cellules inflammatoires au niveau pulmonaire a été mesurée dans le liquide du lavage bronchoalvéolaire (LBA) provenant d'animaux témoins et injectés aux billes de Sephadex par voie intraveineuse ou intratrachéale. Le LBA a été réalisé chez le cobaye selon la méthode préalablement décrite (Sirois et coll, 1982). Brièvement, après sacrifice de l'animal, la trachée a été cannulée avec un cathéter joint à deux seringues (60 ml) par un système de valve à trois voies et un tampon phosphate salin préalablement réchauffé à 37 °C est introduit dans les poumons de l'animal par aliquots de 5 ml (volume total de 60 ml) et réaspiré avec une seconde seringue après un massage léger des poumons. Les dix premiers ml ont été récupérés et centrifugés (360 g, 10 min., 20 °C). Le surnageant a été échantillonné en plusieurs aliquots de 0.5 ml et conservés à - 80 °C pour l'analyse ultérieure des médiateurs. Les cellules récupérées dans le reste du LBA ont été ensuite centrifugées (360 g, 10 min., 20 °C) et resuspendues avec les cellules de la première centrifugation dans 5 ml du même tampon phosphate. Les cellules totales

isolées du LBA sont comptées à l'aide d'un hématimètre (d'après l'équation 2) et les populations cellulaires du LBA (macrophages, éosinophiles, neutrophiles et lymphocytes) ont été identifiées sur des préparations cytologiques par coloration au Wright comme décrit ci-dessus.

## **2 MESURE *EX VIVO* DE LA RÉACTIVITÉ DES VOIES RESPIRATOIRES DE COBAYE**

La réactivité de la bronche principale, de la bronche inférieure et du parenchyme pulmonaire isolés de l'arbre trachéobronchique provenant de cobayes témoins ou injectés aux billes de Sephadex a été mesurée *ex vivo* par essais biologiques dans des bains en cascade. Les bronches principales correspondent aux premières bronches extrapulmonaires qui se divisent de la trachée. Les bronches inférieures correspondent à la première génération de bronches intrapulmonaires chez le cobaye. Le parenchyme pulmonaire est une préparation tissulaire très hétérogène qui contient les petites bronches et bronchioles. Après sacrifice de l'animal, les poumons ont été rapidement prélevés et placés dans une solution de Krebs (composition en mM: NaCl 118, KCl 4.7,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.18,  $\text{NaHCO}_3$  25,  $\text{CaCl}_2$  2.51,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  1.18 et glucose 11.1). Des bandelettes de parenchyme pulmonaire (3 x 3 x 30 mm) ont été coupées à partir des lobes inférieurs selon la méthode décrite par Lulich et coll. (1976) et modifiée par Sirois et coll (1981). Les bronches (droite et gauche) ont été isolées après dissection du parenchyme pulmonaire et des tissus conjonctifs adjacents en utilisant une petite tige de métal (0.4 à 0.5 mm de diamètre) comme support.

Chaque bronche a été divisée en deux segments (principale ou extrapulmonaire et inférieure ou intrapulmonaire) et coupée en spirale. Le diamètre de la bronche principale et de la bronche inférieure est de 1 à 1.2 mm et de 0.2 à 0.8 mm respectivement (Sirois et coll., 1981). Chaque préparation tissulaire a été placée dans un système de bains en cascade et perfusée à la vitesse de 5 ml / min avec une solution de Krebs oxygénée (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) maintenue à une température de 37 °C. Après application d'une tension initiale de 1.5 gr à tous les tissus isolés, ces derniers ont été équilibrés pendant 60 min. Une courbe dose-réponse à l'histamine (9 x 10<sup>-10</sup> à 4.5 x 10<sup>-6</sup> moles) et à l'acétylcholine (6.79 x 10<sup>-10</sup> à 1.36 x 10<sup>-5</sup> moles) (Sigma Chemicals Inc., St-Louis, MO) (injection en bolus) a été réalisée. Les contractions ont été mesurées à l'aide d'un transducteur de type Grass FT03 C mesurant des forces isométriques et enregistrées à l'aide d'un polygraphe de type Grass (modèle 7D). L'affinité apparente (pD<sub>2</sub>) déterminée pour l'histamine et l'acétylcholine sur les diverses préparations tissulaires est définie comme:

$$pD_2 = -\log_{10} ED_{50} \text{ (équation 3)}$$

ED<sub>50</sub>: dose induisant 50 % de la contraction maximale

Les variations dans la réactivité bronchique observées dans les différents niveaux de l'arbre trachéobronchique entre les animaux injectés aux billes de Sephadex et les animaux témoins sont évaluées par comparaison des contractions maximales (E<sub>max</sub>) et de la valeur de pD<sub>2</sub> des agents contractiles.

### 3 HISTOLOGIE

Après sacrifice des animaux témoins et injectés aux billes de Sephadex, les bronches principales et inférieures ainsi que le parenchyme pulmonaire ont été prélevés et disséqués comme décrit précédemment. Cependant, les bronches n'ont pas été coupées en spirales. Les tissus isolés ont été immergés dans une solution d'ite de Bouin pendant 3 hrs. Les échantillons tissulaires ont été ensuite rincés dans une solution d'alcool à 30 %, déshydratés par passage dans différents bains contenant de l'alcool à diverses concentrations puis enrobés de paraffine. Des sections de 5 µm d'épaisseur prélevées à intervalle de 30 µm ont été placées sur des lames de verre préalablement recouverte de poly-L-lysine. Les lames ainsi préparées ont été colorées avec l'hématoxyline-éosine afin de permettre l'analyse histologique de ces tissus. L'analyse histologique a consisté à l'examen de 6 plages sur une même coupe de tissu afin de déterminer les principales caractéristiques histopathologiques présentes chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex (localisation et degré d'infiltration des cellules inflammatoires, intégrité de l'épithélium bronchique, formation d'œdème...) en comparaison des animaux témoins. Cette procédure a été répétée sur plusieurs coupes (10 à 20) d'un même tissu et pour plusieurs animaux (3 à 5) dans un même groupe. L'intensité de l'infiltration des éosinophiles dans les poumons a été arbitrairement définie par rapport aux animaux témoins comme étant importante (+++), moyenne (++), faible (+) ou absente (-).

#### **4 TEMPS DE MESURE DES DIVERS PARAMÈTRES**

Après avoir établi les divers protocoles expérimentaux pour l'induction de l'inflammation pulmonaire et la mesure de l'HRB *ex vivo* chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex, nous avons décidé de mesurer les changements dans le nombre d'éosinophiles sanguins, le degré de l'infiltration des cellules inflammatoires au niveau pulmonaire et dans la réactivité bronchique, 1, 7 et 14 jours après l'injection des billes de Sephadex G-50 (temps longs). Dans une autre série d'expériences, ces trois paramètres ont été étudiés 1, 3, 6 et 12 hrs après l'injection des billes de Sephadex (temps courts).

#### **5 ÉTUDE DES MÉCANISMES POTENTIELLEMENT IMPLIQUÉS DANS L'HYPERRÉACTIVITÉ BRONCHIQUE**

Six protocoles furent élaborés afin d'étudier les mécanismes potentiellement impliqués dans le développement et le maintien de l'hyperméactivité bronchique chez le cobaye suite à l'injection des billes de Sephadex. Nous avons déterminé le nombre d'éosinophiles tissulaires et l'activation des éosinophiles en mesurant respectivement l'activité EPO retrouvée au niveau tissulaire et dans le liquide du LBA. Dans l'étude de l'identification des autres événements inflammatoires présents dans ce modèle, nous avons aussi déterminé la possibilité d'une activation des mastocytes (mesure de la libération d'histamine), d'une activation des cellules inflammatoires en général (mesure de l'activité  $\beta$ -glucuronidase contenue dans le liquide du LBA), des changements dans la perméabilité

microvasculaire (mesure de l'extravasation plasmatique par la méthode de marquage de l'albumine sérique par le bleu d'Evans) et dans la perméabilité capillaire bronchoalvéolaire (mesure du contenu en protéines totales et en albumine dans le liquide du LBA). Finalement, nous avons aussi étudié la possibilité d'une activation du complément sanguin (test hémolytique) après l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye puisque des études ont montré que le Dextran était une substance capable d'activer le complément sanguin *in vitro* (VIDEM et MOLLNES, 1994).

### **5.1 Détermination du nombre d'éosinophiles tissulaires et de l'activation des éosinophiles**

Le nombre apparent d'éosinophiles présents dans la trachée, la bronche principale et la bronche inférieure chez les cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex a été déterminé en mesurant l'activité EPO par essai colorimétrique. L'activité EPO a été mesurée en utilisant le o-phenylènediamine dihydrochlorure (OPD; un substrat non hydrolysé par la myéloperoxidase) comme substrat de la EPO tel que décrit par STRATH et coll. (1985) et WHITE et coll. (1991). Brièvement, la solution de substrat (75 µl) consiste en un mélange de 0.1 mM d'OPD (Sigma Chemicals Inc., St-Louis, MO) dissout dans 0.05 mM Tris-HCl avec 0.1 % de Triton X-100 et 1 mM de peroxyde d'hydrogène (Sigma Chemicals Inc., St-Louis, MO). Une courbe d'étalonnage de l'activité EPO retrouvée dans les éosinophiles en fonction du nombre d'éosinophiles (population de cellules normodenses préalablement purifiées; MAGHNI et coll., 1993) a été réalisée. Les éosinophiles ( $10^3$  -  $10^6$  cellules) ont été resuspendues dans 50 µl de Krebs et



incubées avec 75 µl de la solution de substrat. Les cellules ont été incubées pendant 15 min à 20 °C et la réaction est arrêtée par l'addition de 50 µl d'une solution d'acide sulfurique 4 M suivie par une centrifugation à 400 g pendant 5 min à 4 °C. Un aliquot de 150 µl du surnageant est prélevé et l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 492 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Titertek Multiskan (MC, Flow laboratories). La trachée (divisée en segments de 5 mm) et les bronches principales et inférieures (isolées comme décrit préalablement) ont été placées dans 100 µl de Krebs et incubés avec 150 µl de la solution de substrat pendant 15 min à 37 °C. La réaction a été arrêtée par l'addition de 100 µl d'acide sulfurique 4M et un aliquot de 150 µl du surnageant a été prélevé pour la détermination de l'activité EPO par spectrophotométrie telle que décrit ci-dessus. La courbe d'étalonnage préalablement réalisée permet de déterminer le nombre d'éosinophiles présents dans le tissu. Le blanc de l'essai spectrophotométrique correspond à 50 µl de Krebs subissant les mêmes étapes préalablement décrites pour l'échantillon.

L'activation des éosinophiles a été déterminée par la mesure de l'activité EPO retrouvée dans le liquide du LBA (50 µl) selon la même procédure que celle décrite ci-dessus. L'activité EPO (exprimée en unité / ml) a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec diverses concentrations de peroxydase de raifort de type I (EC 1. 11. 1. 7; Sigma Chemicals Inc., St-Louis, MO) (5 à 61 unités/ml). L'activité de la peroxydase de Raifort a été aussi évaluée par colorimétrie en utilisant le OPD comme substrat de la réaction enzymatique. Une unité peroxydase est définie comme la quantité de peroxydase nécessaire pour former 1.0

mg de pupyrogallin à partir du pyrogallol pendant 20 sec à 20 °C (pH 6) (WELINDER, 1979). Le blanc de l'essai spectrophotométrique correspond à 50 µl de tampon phosphate salin subissant les mêmes étapes préalablement décrites pour l'échantillon du LBA.

## **5.2 Activation des mastocytes**

L'activation des mastocytes a été déterminée par la mesure de la quantité d'histamine retrouvée dans les échantillons du liquide du LBA. La quantité d'histamine a été mesurée en suivant strictement la méthode développée par Marwaha et coll. (1985) basée sur la réaction de Pauly (réaction de diazotation). Cependant, cette méthode mesure aussi l'histidine contenu dans les protéines, il est donc nécessaire de précipiter les protéines contenues dans le liquide du LBA. La précipitation des protéines de l'échantillon du LBA (500 µl) a été réalisée par l'ajout de 125 µl d'une solution 1.4 N d'acide chlorhydrique. Après centrifugation des échantillons, un aliquot de 500 µl du surnageant a été incubé avec 100 µl d'une solution à 1 % d'acide sulfanilique (dissout dans une solution 1.4 N d'acide chlorhydrique) et 100 µl d'une solution à 5 % de nitrite de sodium pendant 10 min à 20 °C. Après neutralisation du milieu d'incubation par 1.3 ml d'une solution à 5 % de carbonate de sodium, le complexe coloré orange a été stabilisé par l'ajout d'une solution à 75 % d'alcool (exactement 2 min après l'addition de la solution de carbonate de sodium). Le complexe stabilisé (200 µl de l'aliquot) a été mesuré par spectrophotométrie (longueur d'onde  $\lambda = 530$  nm) et la quantité d'histamine présente dans l'échantillon a été calculée à l'aide d'une courbe d'étalonnage. La courbe

d'étalonnage a été déterminée à l'aide de diverses concentrations d'histamine (500  $\mu$ l d'une solution de 10 à 40  $\mu$ g/ml d'histamine) en employant le même protocole que celui décrit ci-dessus (incluant l'étape de précipitation des protéines). Le blanc de l'essai spectrophotométrique correspond à 500  $\mu$ l de tampon phosphate salin subissant les mêmes étapes préalablement décrites pour l'échantillon du LBA. La quantité de protéines totales présentes dans le LBA représente environ 25 % de la quantité apparente d'histamine déterminée dans l'échantillon du LBA avant précipitation des protéines.

### **5.3 Mesure de la $\beta$ -glucuronidase**

Afin de déterminer la cinétique de l'activation des cellules inflammatoires suite à l'injection des billes de Sephadex dans les poumons, l'activité  $\beta$ -glucuronidase retrouvée dans le liquide du LBA a été quantifiée. L'activité  $\beta$ -glucuronidase a été mesurée par la détermination spectrophotométrique de la formation du phénolphthaléine libéré de l'acide phénolphthaléine mono- $\beta$ -glucuronique par l'action de cet enzyme, selon la méthode décrite par WALLS et coll. (1991). Un aliquot de 125  $\mu$ l du liquide du LBA a été incubé à 56 °C pendant 1 h en présence de 50  $\mu$ l d'une solution d'acide phénolphthaléine mono- $\beta$ -glucuronique 0.03 M (pH 4.5; Sigma Chemicals Inc., St-Louis, MO) et de 75  $\mu$ l d'un tampon acétate de sodium 0.2 M (pH 4.5). À la fin du temps d'incubation, un aliquot de 1.25 ml d'un tampon de 2-amino-2-méthyl-1-propanol contenant 0.2 % de lauryl sulfate de sodium (pH 11.0; Sigma Chemicals Inc., St-Louis, MO) a été ajouté et un aliquot de 200  $\mu$ l du mélange a été prélevé pour la mesure de

l'absorption du phénolphthaléine formé (longueur d'onde  $\lambda = 550$  nm). La quantité de phénolphthaléine formée a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec diverses concentrations de phénolphthaléine (5 à 40  $\mu\text{g/ml}$ ) (Sigma Chemicals Inc., St-Louis, MO) et le résultat est exprimé en unité d'activité  $\beta$ -glucuronidase; 1 unité représente l'activité nécessaire pour générer 1  $\mu\text{g}$  de phénolphthaléine dans les conditions de l'essai (WALLS et coll., 1991). Le blanc de l'essai spectrophotométrique correspond à 125  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate salin subissant les mêmes étapes préalablement décrites pour l'échantillon du LBA.

#### **5.4 Perméabilité vasculaire et œdème**

La perméabilité vasculaire a été mesurée en utilisant le bleu d'Evans comme marqueur de l'extravasation des protéines plasmatiques et l'œdème par la quantité d'eau présente dans les tissus isolés. La mesure de la perméabilité vasculaire a été basée sur la méthode initialement décrite par JANCAR et coll. (1988). Dans toutes les expériences, 20 mg/kg de bleu d'Evans (Sigma Chemicals Inc., St-Louis, MO) a été injecté par voie intravéneuse (veine de l'oreille après anesthésie locale avec la xylocaïne 2 %) chez le cobaye conscient 10 min avant la fin du temps suivant l'injection de saline ou de Sephadex G-50 (24 mg/kg). Après sacrifice de l'animal, la circulation pulmonaire a été perfusée pendant 2 min avec une solution phosphate salin (4 ml/min, 22 °C) via l'artère pulmonaire (après sectionnement de l'apex du coeur) pour éliminer toute trace de bleu d'Evans de la circulation pulmonaire et bronchique. Durant ce temps, les poumons de l'animal ont été gonflés par l'introduction d'air

via la trachée afin de favoriser la perfusion des poumons par le tampon de phosphate salin. Après arrêt de la perfusion, la trachée, les bronches principales, les bronches inférieures (divisées en deux et désignées en une partie proximale et distale), le parenchyme pulmonaire, le coeur, la rate, le foie, le rein (droit et gauche), le pancréas, le duodénum, le quadriceps droit, le diaphragme et la peau ont été isolés et coupés en deux parties pratiquement égales composant alors deux groupes de tissus. Le groupe 1 de tissus permet de déterminer le poids humide puis le poids sec des mêmes tissus après étuvage à 37 °C pendant 24 hrs. Les tissus du groupe 2 ont été placés dans un volume (V) de formamide (Fisher) calculé d'après le poids initial (humide) du tissu selon:

$$V_{(\mu l)} = m \times 4 \quad m: \text{masse du tissu humide (mg)}$$

*(équation 4)*

Si le volume V de formamide est inférieur à 75  $\mu$ l, le volume V calculé doit être doublé car 75  $\mu$ l sont nécessaires à la détermination de la quantité de bleu d'Evans par spectrophotométrie d'absorption. Cette dilution sera prise en compte dans le calcul de la quantité totale de bleu d'Evans contenu dans le tissu.

Les tissus ont été placés pendant 24 hrs dans la formamide. Le bleu d'Evans (75  $\mu$ l) ainsi extrait a été mesuré par dosage colorimétrique à une longueur d'onde de 620 nm en utilisant un spectrophotomètre d'absorption Titertek Multiskan MC. La quantité de bleu d'Evans extraite du tissu a été

déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage de bleu d'Evans (0.625 µg / ml à 2.5 mg/ml) et calculée selon:

Quantité de bleu d'Evans =  $(A \times b \times c) / (m_1 / m_2)$  (équation 5)

(µg / poids de tissu sec)  $b = (1/p) \times 4$  (équation 6)

A: absorbance mesurée à 620 nm soustraite de l'absorbance du blanc

p: valeur de la pente de la courbe d'étalonnage de bleu d'Evans

4: facteur de dilution provenant de l'ajout de formamide

c: facteur de dilution supplémentaire (si  $V < 75 \mu\text{l}$ )

$m_1$ : poids du tissu sec

$m_2$ : poids du tissu humide

L'œdème tissulaire (correspondant à une augmentation du poids en eau du tissu) a été calculé selon:

œdème =  $\{1 - (m_1 / m_2)\}$  (équation 7)

## 5.5 Perméabilité bronchoalvéolaire

La perméabilité bronchoalvéolaire a été déterminée en mesurant par spectrophotométrie d'absorption la quantité de protéines totales et la quantité d'albumine contenues dans les échantillons du LBA des animaux témoins et injectés aux billes de Sephadex. La quantité de protéines totales contenues dans les échantillons du LBA a été déterminée par la méthode de Bradford (1951) adaptée pour de petites quantités de protéines. La

quantité totale de protéines a été déterminée en utilisant un kit de dosage de protéines Bio-Rad (Bio-Rad, Richmond, CA) qui consiste à incuber 200  $\mu$ l de la solution de la solution de colorant (contenant du bleu de Commassie) avec 10  $\mu$ l de l'échantillon du LBA. Le contenu en protéines a été mesuré par dosage colorimétrique ( $\lambda = 595$  nm) et une courbe d'étalonnage réalisée avec de l'albumine sérique de bovin (10  $\mu$ l d'une solution de 0.1 à 0.8 mg/ml) (Sigma Chemicals Inc., St-Louis, MO) permet de déterminer la quantité totale de protéines dans l'échantillon. Le blanc de l'essai spectrophotométrique correspond à 10  $\mu$ l de tampon phosphate salin subissant les mêmes étapes préalablement décrites pour les échantillons du LBA.

La mesure de l'albumine sérique contenue dans les échantillons du LBA est essentiellement basée sur la méthode du vert de bromocrésol décrite par DOUMAS et coll. (1971) qui est sélective pour l'albumine (pas de réaction croisée avec la  $\gamma$  globuline ou autres protéines sériques). Brièvement, le liquide du LBA (80  $\mu$ l) a été incubé avec 120  $\mu$ l du réactif de vert de bromocrésol (composition: 1 volume d'une solution mère de vert de bromocrésol (0.6 mM) dilué dans 3 volumes d'un tampon de succinate de sodium (0.1 M; pH 4.0) additionné de 4 ml d'une solution à 30 % de Brij-35 par litre de réactif) pendant 10 min à 20 °C (incubation directe dans la plaque). L'albumine contenue dans les échantillons du LBA a été mesurée par spectrophotométrie (longueur d'onde  $\lambda = 630$  nm) et quantifiée à l'aide d'une courbe d'étalonnage réalisée avec diverses concentrations d'albumine (80  $\mu$ l d'une solution de 0.025 à 0.67 mg/ml) déterminée dans les mêmes conditions décrites ci-dessus. Le blanc de l'essai

spectrophotométrique correspond à 80  $\mu$ l de tampon phosphate salin subissant les mêmes étapes préalablement décrites pour les échantillons du LBA.

## **5.6 Activation du complément sanguin**

L'activation du complément sanguin chez les animaux injectés aux billes de Sephadex a été mesurée à l'aide d'un test hémolytique basé sur les méthodes développées par KLERX et coll. (1983) et SERVAIS et coll. (1991). L'essai hémolytique a été basé sur la lyse des érythrocytes isolés de lapin par le complément (activation de la voie alternative) présent dans le plasma de cobaye. Le sang de lapin a été prélevé à partir d'une artère de l'oreille et récupéré dans un tube contenant une solution de citrate de sodium 3.15 % et de glucose 2.45 % (pH 7.4; tampon I). Après centrifugation du sang (400 g, 10 min, 20 °C) et isolation des érythrocytes (élimination du plasma), ces cellules ont été lavées avec 10 ml de tampon I puis 2 x 10 ml du tampon véronale-EGTA (composition du tampon véronale: barbital de sodium 7 mM, NaCl 0.15 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.15 mM, 0.1 % de gélatine (v/v); pH 7.4; composition du tampon véronale-EGTA: tampon véronale additionné de EGTA 8 mM et MgCl<sub>2</sub> 5 mM). Après la série de lavages, les érythrocytes ont été resuspendus dans le tampon véronale-EGTA, ajustés à une concentration de  $5 \times 10^8$  cellules/ml et conservés à 4 °C pendant une semaine en changeant chaque jour le tampon. Les plasmas recueillis des cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex ont suppléés avec une solution EDTA 5 mM (50  $\mu$ l d'une solution 250 mM EDTA par ml de plasma). Lors de l'essai hémolytique, un



aliquot de 30  $\mu$ l de la suspension d'érythrocytes de lapin a été incubé avec 100  $\mu$ l de diverses dilutions de plasma de cobaye effectuées dans le tampon véronale-EGTA (préparation de 1 ml des dilutions de plasma de 1:2, 1:3, 1:4, 1:6, 1:8 et 1:9 additionées d'une solution contenant EGTA 10 mM et  $\text{MgCl}_2$  7 mM). Les échantillons ont été incubés pendant 45 min à 37 °C. À la fin de l'incubation, 30  $\mu$ l d'une solution EDTA 0.2 M a été ajouté (inhibition de l'activation du complément restant à la fin de l'essai) et les échantillons ont a été centrifugés à 1600 g pendant 3 min à 20 °C. Un aliquot de 100  $\mu$ l du surnageant a été prélevé et l'absorbance de l'hémoglobine libre a été mesurée à une longueur d'onde de 414 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Titertek Multiskan. Pour la détermination du pourcentage de lyse attribuable au complément sanguin, il est nécessaire de déterminer la lyse non associée à l'action du complément (témoin négatif) (30  $\mu$ l d'érythrocytes de lapin + 100  $\mu$ l de plasma dilué + 30  $\mu$ l EDTA 0.2 M), la lyse spontanée des érythrocytes (témoin 0 %) (30  $\mu$ l d'érythrocytes de lapin + 130  $\mu$ l de tampon véronale-EGTA) et la lyse totale (témoin 100 %) (30  $\mu$ l d'érythrocytes de lapin + 130  $\mu$ l d'eau distillée). Dans le cas du témoin négatif, l'activation de la voie alternative du complément étant dépendante du calcium, elle a été inhibée par l'addition de l'EDTA 0.2 M. Pour ces trois témoins, les échantillons sont aussi incubés à 37 °C pendant 45 min, centrifugés et un aliquot de 100  $\mu$ l du surnageant a été prélevé pour la détermination de l'hémoglobine libérée dans le milieu d'incubation. Le pourcentage de lyse (Y) a été calculé pour chacune des dilutions de plasma de cobaye suivant:

$$Y = (DO_{\text{test hémolytique}} - DO_{\text{témoin négatif}} / DO_{\text{lyse 100 \%}} - DO_{\text{lyse 0 \%}}) \times 100$$

(équation 8)

Pour le calcul de la concentration de complément donnant 50 % de lyse via la voie alternative (1 unité AP50), les résultats ont été transformés selon l'équation de Van Krogh modifié par KLERX et coll.(1983) impliquant une représentation logarithmique (linéarisation) des données selon:

$$\text{Log}_{10} (Y / 100 - Y) = \text{Log}_{10} (\text{dilution de plasma}) \text{ (équation 9)}$$

L'activité du complément AP50 exprimée en unité/ml est calculée selon:

$$\text{AP50} = 10^{1+P} \text{ (équation 10)}$$

avec P déterminé par l' intersection de la droite avec l'axe des x pour  $\log (Y / 100 - Y) = 0$  soit  $Y = 50 \%$ .

L'activation directe du complément sanguin de cobaye par le Dextran composant les billes de Sephadex est déterminée *ex vivo* en incubant 1 ml de sang totale de cobaye avec (ou sans dans le cas des témoins) 1 mg de billes de Sephadex G-50 à 37 °C pendant 1, 3 et 6 hrs. Après le temps d'incubation, les échantillons sont centrifugés et le plasma est prélevé. L'activité du complément dans les plasmas est déterminée selon la méthode décrite ci-dessus.

## **6 ANALYSES STATISTIQUES ET ÉTUDES DE CORRÉLATION**

Les divers résultats de cette étude ont été analysées avec le test t de Student pour les données non pairées et le cas échéant avec le test t de student pour les données pairés (logiciel "Primer of Biostatistics"; Macintosh). Les études de corrélations ont été réalisées par la procédure de "Spearman rank-order correlation" (logiciel "Primer of biostatistics; Macintosh) qui donne la valeur de la corrélation ( $r$ ) et l'existence d'une différence significative entre les groupes de données.

## RESULTATS

### **1. INDUCTION DE L'INFLUX DE CELLULES INFLAMMATOIRES DANS LES POUMONS DE COBAYE SUTTE À L'INJECTION DE BILLES DE SEPHADEX**

#### **1.1 Induction par divers types de billes de Sephadex**

Le LBA provenant d'animaux témoins contenait majoritairement des macrophages (environ 90 %) et une faible proportion d'éosinophiles (7.5 %), de neutrophiles (0.2 %) et de lymphocytes (1.1 %) (Tableau IV). L'injection de saline n'a pas changé le nombre de chacune des populations cellulaires retrouvées dans le LBA en comparaison des animaux témoins non injectés (résultats non montrés). Tel que montré au Tableau IV, l'injection intraveineuse de billes de Sephadex G-50 (24 mg/kg) chez le cobaye conscient a induit 24 hrs après l'injection une augmentation du nombre de macrophages-monocytes, d'éosinophiles, de neutrophiles et de lymphocytes de 1.5, 23, 356 et 18 fois respectivement, en comparaison des animaux témoins. La dose de 24 mg/kg de billes de Sephadex G-50 fut la plus forte dose administrée étant non-léthale (résultats non montrés).

Afin de définir si l'induction de l'inflammation pulmonaire était dépendante du type de billes de Dextran utilisé, les billes de Sephadex (Superfine) du type G-75, G-100 et G-200 ont été testées chez le cobaye. L'injection intraveineuse d'une dose de 24 mg/kg de Sephadex G-75 ou G-100 a provoqué une mort quasi immédiate (résultats non montrés).

Tableau IV: Populations cellulaires retrouvées dans le LBA de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex G-50 (24 mg/kg), 1 jour après l'injection des billes.

	Nombre de cellules ( $\times 10^6$ ) <sup>a</sup>				
	CT	M	E	N	L
Témoin (n = 6)	$20.30 \pm 0.84$	$18.50 \pm 0.77$	$1.52 \pm 0.09$	$0.05 \pm 0.01$	$0.22 \pm 0.03$
Sephadex <sup>†</sup> (n = 12)	$84.53 \pm 4.80$	$27.35 \pm 2.42$	$35.49 \pm 1.98$	$17.78 \pm 1.69$	$3.89 \pm 0.17$

CT: cellules totales      M: macrophages-monocytes      E: éosinophiles

N: neutrophiles      L: lymphocytes

<sup>a</sup>Identification des populations cellulaires par coloration de préparations cytologiques au Wright.

Les valeurs ( $\times 10^6$  cellules) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de n expériences séparées. <sup>†</sup>:  $P < 0.01$  en comparaison des populations cellulaires respectives retrouvées dans le groupe témoin (test t de Student pour des données non pairées).

Lorsque des billes de Sephadex G-200 (24 mg/kg) ont été mises en suspension, elles se sont agglutinées entre elles, rendant ainsi l'injection impossible. Le Tableau V indique que les divers types de billes de Sephadex utilisées ne présentent pas les mêmes caractéristiques. Le nombre de billes pour une masse donnée (50 mg) est différent suivant le type de billes de Sephadex (Tableau V). Sur la base de ces données, nous avons trouvé que l'injection intraveineuse d'une dose de 14.27 mg/kg de Sephadex G-75, 8.0 mg/kg de Sephadex G-100 et 10.71 mg/kg de Sephadex G-200 fut non-léthale pour le cobaye. L'injection des billes de Sephadex G-75, G-100 et G-200 chez le cobaye a augmenté le nombre total de cellules retrouvées dans le LBA de 3.5, 2.6 et 3.8 fois, respectivement, 24 hrs après l'injection (Tableau VI). Le nombre de macrophages-monocytes retrouvés dans le LBA des animaux injectés avec les billes de Sephadex G-100 n'a pas augmenté à l'opposé des cobayes injectés avec les billes de Sephadex G-75 et G-200 (Tableau VI). Tel que montré au Tableau VI, la population d'éosinophiles et de neutrophiles retrouvés dans le LBA suite à l'injection des billes de Sephadex G-75, G-100 et G-200 a représenté respectivement 35, 61 et 44 %, 24, 2 et 12 % du nombre de cellules totales du LBA. Tandis que les lymphocytes identifiés dans le LBA n'ont représenté que 1.7, 2.4 et 2.9 % des cellules totales du LBA.

Tableau V: Caractéristiques des divers types de billes de Sephadex (Superfine)

	G-50	G-75	G-100	G-200
Nombre de billes (x 10 <sup>6</sup> /50 mg) <sup>a</sup>	3.08 ± 0.10	4.49 ± 0.17	0.17 ± 0.01	2.80 ± 0.32
Poids moléculaire (x 10 <sup>3</sup> g) <sup>b</sup>	0.5-10	1-50	1-100	1-200
Diamètre des billes (μm) <sup>b,c</sup>	20-50	20-50	20-50	20-50

<sup>a</sup>Nombre de billes mesurées à l'aide d'un hématimètre

<sup>b</sup>Données de la compagnie Pharmacia

<sup>c</sup>Diamètre des billes sèches selon la compagnie Pharmacia

Les valeurs (x 10<sup>6</sup> billes/50 mg) représentent la moyenne ± S.E.M. des données obtenues de 4 expériences séparées.

Tableau VI: Populations cellulaires retrouvées dans le LBA 24 hrs après l'injection de divers types de billes de Sephadex (Superfine) chez le cobaye.

	Nombre de cellules (x 10 <sup>6</sup> )				
	CT	M	E	N	L
G-75 <sup>a</sup>	70.55 ± 6.92	27.37 ± 3.74	24.90 ± 1.49	16.90 ± 1.77	1.21 ± 0.27
G-100 <sup>b</sup>	52.70 ± 8.67	17.52 ± 3.71	31.97 ± 5.33	1.02 ± 0.24	1.26 ± 0.11
G-200 <sup>c</sup>	77.52 ± 10.00	32.13 ± 8.31	34.31 ± 1.30	9.09 ± 2.65	2.22 ± 0.18

CT: cellules totales M: macrophages-monocytes E: éosinophiles

N: neutrophiles L: lymphocytes

<sup>a</sup>Injection de 14.27 mg/kg <sup>b</sup>Injection de 8.0 mg/kg

<sup>c</sup>Injection de 10.71 mg/kg

Les valeurs (x 10<sup>6</sup> cellules) représentent la moyenne ± S.E.M. des données obtenues de 4 à 8 expériences séparées.



Le degré d'infiltration des cellules inflammatoires étant différent suivant le type de billes de Sephadex, nous avons essayé de déterminer l'existence d'une relation entre le degré d'infiltration des cellules inflammatoires dans les poumons versus le type de billes de Sephadex utilisé. Les billes mises en suspension ont apparus sous trois différentes tailles (observations en microscopie optique), nous les avons donc classées suivant leur taille en trois catégories: grosse (G), moyenne (M) et petite (P). Tel que montré à la Figure 1, pour une même masse donnée de billes (10 mg) la taille des billes est très hétérogène suivant le type de Sephadex. Cependant, il n'existe pas de corrélation entre le degré d'infiltration des cellules inflammatoires dans les poumons de cobaye et la taille respective des billes (résultats non montrés).

## **1.2 Effets de diverses doses de billes de Sephadex G-50**

Les billes de Sephadex G-50 étant plus facile à injecter chez le cobaye, sans doute parce qu'elles contiennent moins de billes de catégorie G, nous avons décidé de réaliser la suite de cette étude avec ce type de billes.

Nous avons déterminé l'effet de diverses doses de billes de Sephadex sur le degré d'infiltration des cellules inflammatoires dans les poumons de cobaye. Tel que montré à la Figure 2, le nombre de cellules totales retrouvées dans le LBA semble effectivement dépendant de la dose de Sephadex G-50 injectée au cobaye. Il est intéressant de noter que la dose de 0.43 mg/kg, une dose 56 fois plus petite que la dose initiale (24 mg/kg),

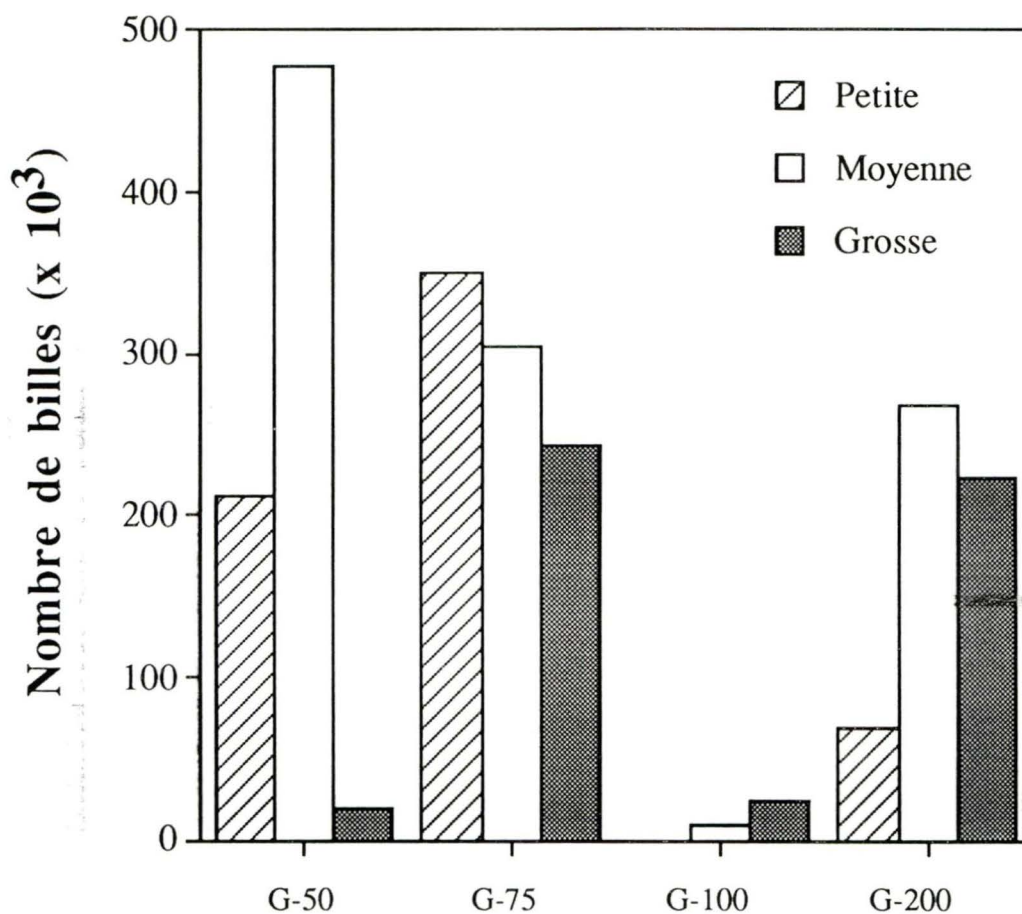


Figure 1: Taille et nombre absolu des billes de Sephadex de type G-50, G-75, G-100 et G-200 (Superfine) pour un poids identique de billes (10 mg). Le nombre et la taille des billes sont déterminés à l'aide d'un hématimètre. Les valeurs ( $\times 10^3$  billes) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 3 déterminations séparées.

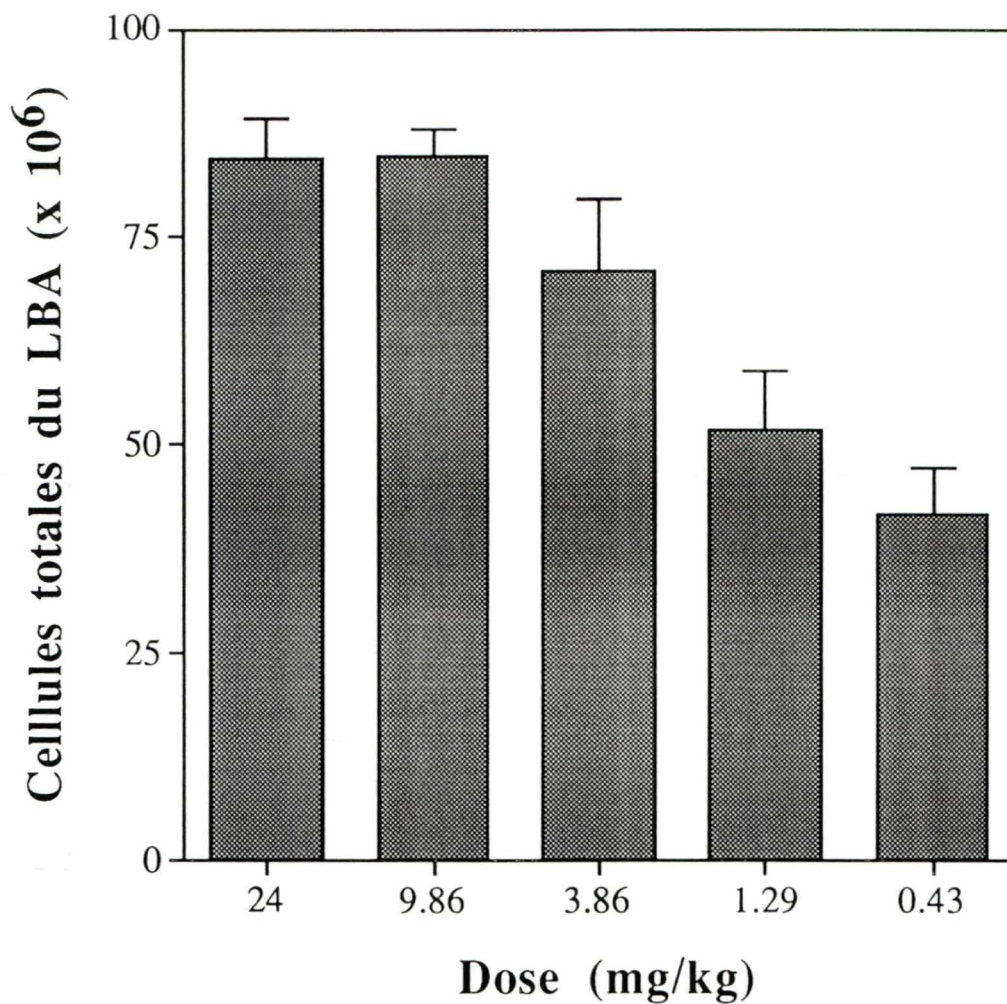


Figure 2: Nombre de cellules totales retrouvées dans le LBA 24 hrs après l'injection de doses décroissantes de billes de Sephadex G-50 chez le cobaye. Les valeurs (x 10<sup>6</sup> cellules) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 4 à 5 expériences séparées.

fut toujours capable d'induire une infiltration marquée de cellules inflammatoires (46 % du nombre de cellules totales du LBA obtenu pour la dose de 24 mg/kg). Le nombre d'éosinophiles retrouvés dans le LBA a diminué à partir de la dose de 1.29 mg/kg de Sephadex G-50 ( $26.21 \pm 2.28 \times 10^6$  éosinophiles) en comparaison de la dose de 24 mg/kg ( $35.49 \pm 1.98 \times 10^6$  éosinophiles) (Figure 3). Alors que le nombre de lymphocytes retrouvés dans le LBA a peu varié en fonction de la dose de billes de Sephadex administrées à l'animal, le nombre de neutrophiles a diminué de 2.7, 5.6 et 15.3 fois aux doses de 3.86, 1.29 et 0.43 mg/kg de billes de Sephadex G-50, en comparaison du nombre de neutrophiles obtenus pour la dose de 24 mg/kg. Le nombre de macrophages-monocytes retrouvés dans le LBA en fonction de la dose de billes administrées à l'animal fut peu différent du nombre obtenu pour une dose de 24 mg/kg (résultats non montrés). Les études de corrélations ont confirmé l'existence d'une très forte relation entre le degré de la neutrophilie pulmonaire et la dose de billes administrées aux cobayes (facteur de corrélation  $r = 0.99$ ;  $P < 0.01$ ) alors que l'éosinophilie pulmonaire varie moins en fonction de la dose de billes de Sephadex administrées à l'animal (facteur de corrélation  $r = 0.81$ ;  $P < 0.05$ ).

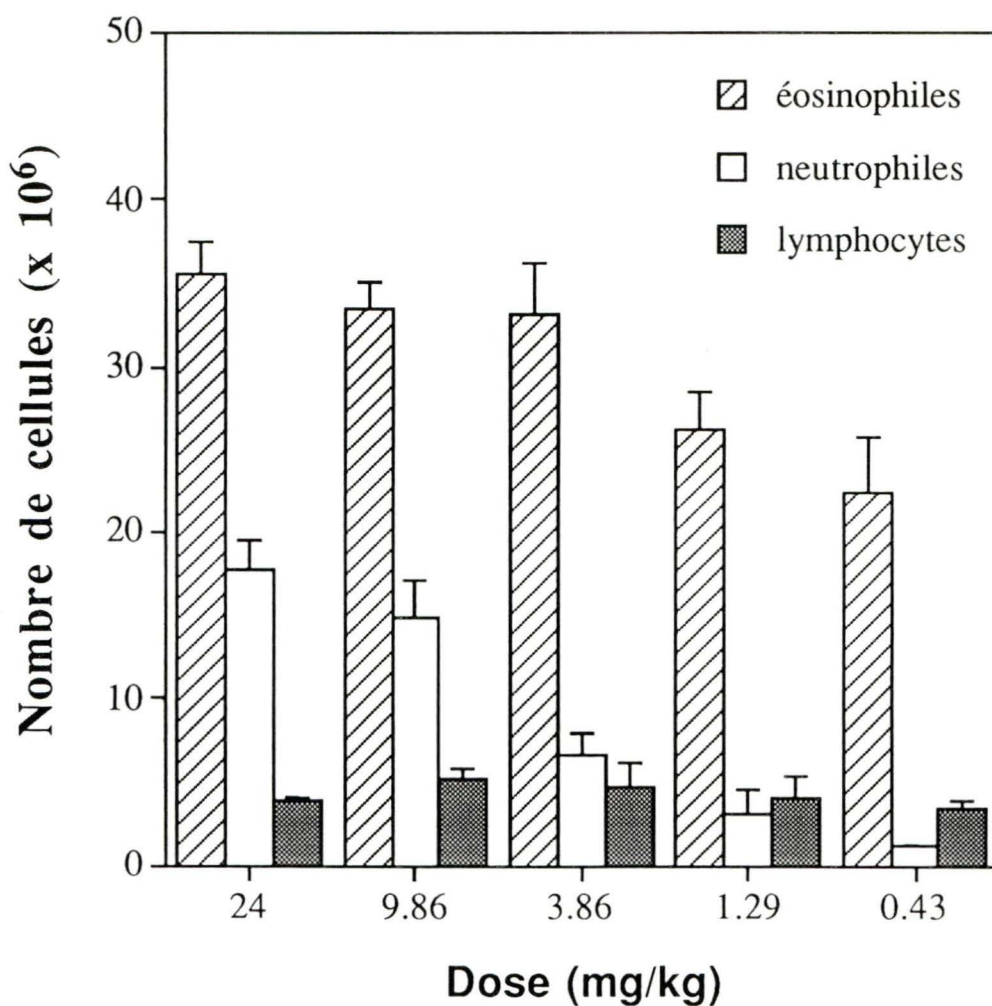


Figure 3: Populations cellulaires retrouvées dans le LBA 1 jour après l'injection de doses décroissantes de billes de Sephadex G-50 chez le cobaye. Les valeurs (x 10<sup>6</sup> cellules) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 4 à 5 expériences séparées.

Tableau VII: Populations cellulaires retrouvées dans le LBA de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex G-50 1, 7 et 14 jours après l'injection des billes.

Population cellulaire du LBA (x 10 <sup>6</sup> cells) <sup>a</sup>	Témoin	Jour 1	Jour 7	Jour 14
Cellules totales	20.65 ± 1.59	87.21 ± 5.14 <sup>†</sup>	68.28 ± 3.49 <sup>†</sup>	53.36 ± 3.94 <sup>†</sup>
Macrophages	18.54 ± 0.97	26.35 ± 2.42 <sup>†</sup>	36.53 ± 1.50 <sup>†</sup>	28.31 ± 1.95 <sup>†</sup>
Éosinophiles	1.61 ± 0.14	35.69 ± 1.98 <sup>†</sup>	29.90 ± 2.42 <sup>†</sup>	23.74 ± 1.72 <sup>†</sup>
Neutrophiles	0.020 ± 0.005	17.75 ± 1.69 <sup>†</sup>	0.14 ± 0.06 <sup>†</sup>	0.005 ± 0.005
Lymphocytes	0.19 ± 0.03	2.95 ± 0.17 <sup>†</sup>	1.70 ± 0.10 <sup>†</sup>	1.71 ± 0.10 <sup>†</sup>
n	12	8	8	6

<sup>a</sup>Le nombre de cellules totales dans le LBA est déterminé à l'aide d'un hématimètre (viabilité cellulaire toujours supérieure à 90 % selon le test d'exclusion du bleu de Trypan) et les populations cellulaires identifiées par coloration de préparations cytologiques par le Wright.

Les valeurs (x 10<sup>6</sup> cellules) représentent la moyenne ± S.E.M. des données obtenues de n expériences séparées. <sup>†</sup>: P < 0.01 en comparaison du groupe témoin (test t de Student pour des données non paires).

## **2. ÉTUDE DE L'INFLAMMATION PULMONAIRE ET DE L'HRB 1, 7 ET 14 JOURS APRÈS L'INJECTION DES BILLES DE SEPHADEX**

### **2.1 Cellules inflammatoires dans le LBA**

Le nombre de cellules totales retrouvées dans le LBA a diminué progressivement de 22 et 39 %, 7 et 14 jours après l'injection des billes de Sephadex en comparaison du nombre obtenu au jour 1 (Tableau VII). Tel que montré au Tableau VII, le nombre de macrophages a augmenté de 39 % 7 jours après l'injection des billes alors que cette population cellulaire a diminué dans le LBA au jour 14 (diminution de 22 % en comparaison au jour 7). Le nombre d'éosinophiles retrouvés dans le LBA a diminué de 15 et 32 % respectivement 7 et 14 jours après l'injection des billes de Sephadex, en comparaison de l'éosinophilie obtenue au jour 1 (Tableau VII). La population de neutrophiles retrouvés dans le LBA a diminué fortement 7 jours après l'injection des billes avec une disparition pratiquement complète des neutrophiles au jour 14 (Tableau VII). La population de lymphocytes a diminué de 42 % 7 jours après l'injection des billes et fut inchangée après 14 jours (Tableau VII).

### **2.2 Nombre d'éosinophiles sanguins**

Tel que montré au Tableau VIII, l'injection des billes de Sephadex G-50 n'a pas augmenté significativement le nombre de leucocytes totaux 1 jour après l'injection des billes. Le nombre de leucocytes totaux a diminué de 26 % 7 jours après l'injection des billes de Sephadex alors qu'au jour 14

Tableau VIII: Nombre de leucocytes totaux et d'éosinophiles retrouvés dans le sang de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex G-50 1, 7 et 14 jours après l'injection.

	Témoin	Jour 1	Jour 7	Jour 14
Cellules totales <sup>a</sup> (cellules / mm <sup>3</sup> )	1770 ± 190	2150 ± 290	1600 ± 80	2370 ± 240
Éosinophiles <sup>b</sup> (cellules / mm <sup>3</sup> )	72 ± 12	300 ± 40 <sup>†</sup>	190 ± 20 <sup>†</sup>	360 ± 30 <sup>†</sup>
n	12	8	8	6

<sup>a</sup>Le nombre total de leucocytes sanguins est déterminé à l'aide d'un hématimètre (viabilité cellulaire toujours supérieure à 90 %).

<sup>b</sup>Les éosinophiles sont identifiés par coloration de préparations cytologiques par le Wright.

Les valeurs (cellules / mm<sup>3</sup> de sang) représentent la moyenne ± S.E.M. des données obtenue de n expériences séparées. <sup>†</sup>: P < 0.01 en comparaison du groupe témoin et <sup>†</sup>: P < 0.01 en comparaison du groupe du jour 1 (test t de Student pour des données non paires).



ce nombre a augmenté de 48 % en comparaison au jour 7 (Tableau VIII). Dans nos conditions expérimentales, le nombre d'éosinophiles trouvés dans le sang d'animaux témoins a représenté environ 4 % du nombre de leucocytes totaux sanguins (Tableau VIII). Tel que montré au Tableau VIII, le nombre d'éosinophiles sanguins a augmenté de 4.2 fois chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex. Le nombre d'éosinophiles sanguins diminue de 37 % au jour 7 en comparaison au jour 1 alors qu'au jour 14 le nombre d'éosinophiles sanguins augmente de 90 % en comparaison au jour 7 après l'injection des billes (Tableau VIII).

## **2.3 Mesure *ex vivo* de la réactivité des voies aériennes**

### **2.3.1 Bronches principales**

L'histamine et l'acétylcholine ont produit des contractions dose-dépendantes de la bronche principale provenant d'animaux témoins et injectés aux billes de Sephadex (Figures 4 et 5). Cependant, l'injection des billes de Sephadex n'a modifié ni la réactivité bronchique, ni la sensibilité (pas de modification de l'affinité apparente  $pD_2$ ) de la bronche principale pour l'histamine ou l'acétylcholine, mesurées 1, 7 et 14 jours après l'injection des billes (Tableaux IX).

Figure 4: Courbes dose-réponses à l'histamine de la bronche principale provenant de cobayes témoins (cercle vide) et injectés aux billes de Sephadex G-50 (cercle plein) 1 (A), 7 (B) et 14 (C) jours après l'injection des billes. Les valeurs (exprimées en g de contraction) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 8 à 17 expériences séparées (voir Tableau IX pour la valeur de n de chaque groupe d'animaux).

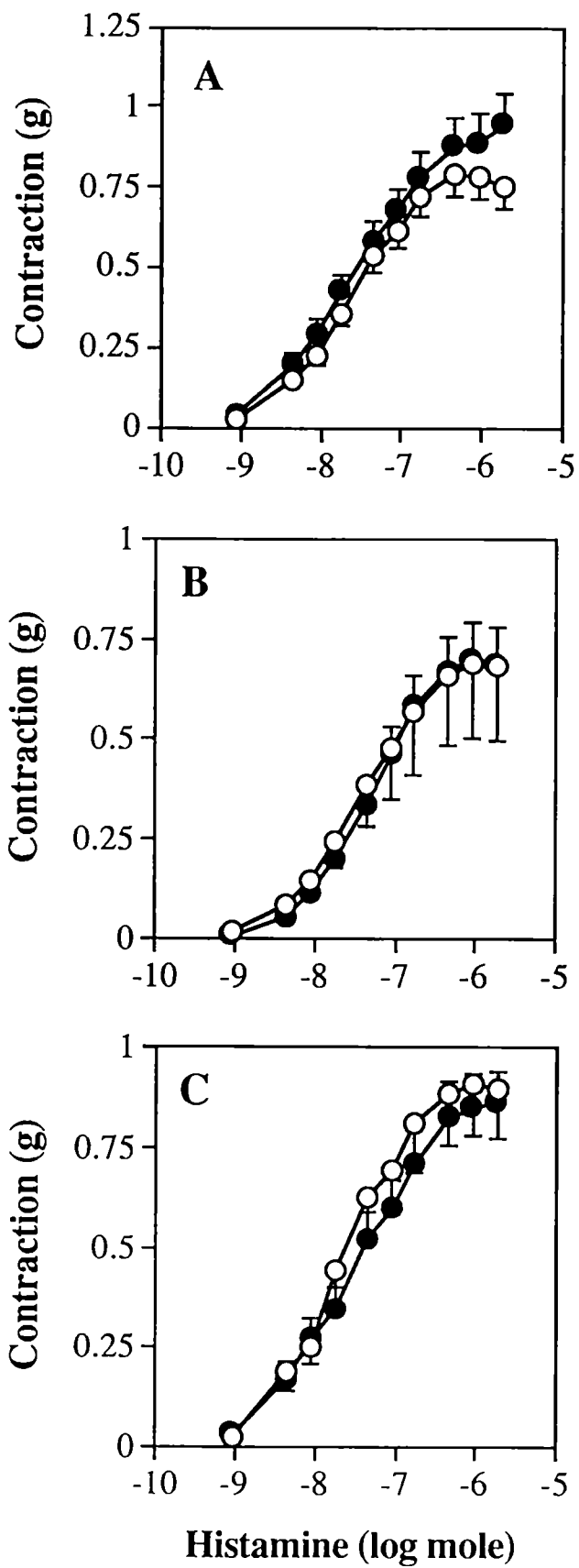


Figure 5: Courbes dose-réponses à l'acétylcholine de la bronche principale provenant de cobayes témoins (cercle vide) et injectés aux billes de Sephadex G-50 (cercle plein) 1 (A), 7 (B) et 14 (C) jours après l'injection des billes. Les valeurs (exprimées en g de contraction) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 8 à 17 expériences séparées (voir Tableau IX pour la valeur de n de chaque groupe d'animaux).

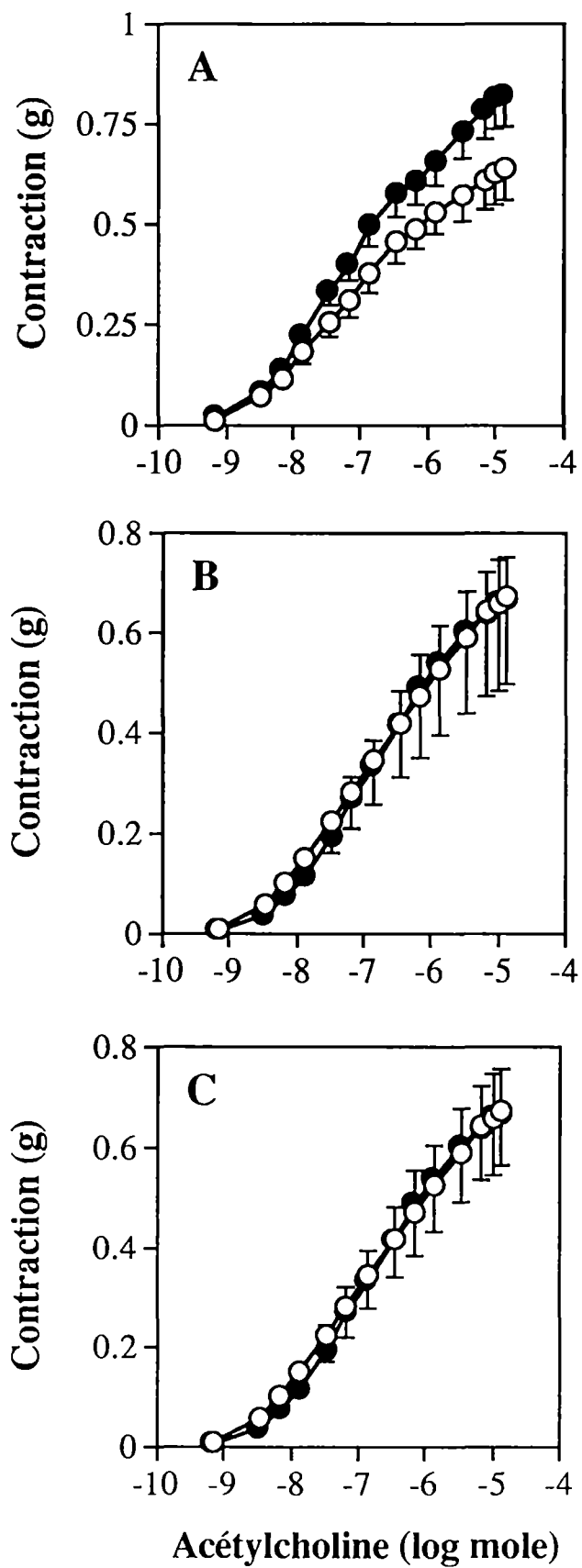


Tableau IX: Valeurs des contractions maximales ( $E_{max}$ ) et des affinités apparentes ( $pD_2$ ) de la bronche principale pour l'histamine et l'acétylcholine provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex (24 mg/kg) 1, 7 et 14 jours après l'injection des billes.

	Jour	Groupe	Histamine	Acétylcholine
$E_{max} (g)$	1	T	$0.782 \pm 0.066 (11)$	$0.610 \pm 0.17 (10)$
		S	$0.887 \pm 0.091(17)$	$0.786 \pm 0.073 (16)$
	7	T	$0.689 \pm 0.191 (8)$	$0.645 \pm 0.168 (10)$
		S	$0.700 \pm 0.095 (9)$	$0.640 \pm 0.084 (9)$
	14	T	$0.909 \pm 0.130 (10)$	$0.675 \pm 0.105 (8)$
		S	$0.850 \pm 0.084 (11)$	$0.783 \pm 0.083 (11)$
$pD_2$	1	T	$7.60 \pm 0.08 (11)$	$6.94 \pm 0.13 (10)$
		S	$7.60 \pm 0.07 (17)$	$7.13 \pm 0.12 (16)$
	7	T	$7.43 \pm 0.08 (8)$	$6.88 \pm 0.07 (10)$
		S	$7.30 \pm 0.06 (9)$	$6.82 \pm 0.08 (9)$
	14	T	$7.40 \pm 0.07 (10)$	$6.91 \pm 0.07 (8)$
		S	$7.43 \pm 0.16 (11)$	$6.90 \pm 0.14 (11)$

T: cobayes témoins    S: cobayes injectés aux billes de Sephadex G-50

$pD_2 = -\log ED_{50}$

Les valeurs des contractions maximales ( $E_{max}$ ; en g de contraction) et des affinités apparentes ( $pD_2$ ) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenue de (n) expériences séparées.

### 2.3.2 Bronches inférieures

Tel que montré aux Figures 6A à 6C, la bronche inférieure provenant d'animaux injectés aux billes de Sephadex a présenté une augmentation de la réactivité à l'histamine. La contraction maximale de ce tissu à l'histamine fut augmentée de 4.6, 2.5 et 3.2 fois, 1, 7 et 14 jours respectivement après l'injection, en comparaison des animaux témoins (Tableau X). Une réponse exagérée à l'acétylcholine fut aussi obtenue au niveau de la bronche inférieure (Figures 7A à 7C). Dans ce cas, l'augmentation de la contraction maximale fut augmentée de 4.8, 2.3 et 2.6 fois, 1, 7 et 14 jours respectivement après l'injection des billes, en comparaison des animaux témoins (Tableau X). Cependant, l'injection des billes de Sephadex n'a pas modifié l'affinité apparente ( $pD_2$ ) de la bronche inférieure envers les deux agents contractiles (Tableau X).

Figure 6: Courbes dose-réponses à l'histamine de la bronche inférieure provenant de cobayes témoins (cercle vide) et injectés aux billes de Sephadex G-50 (cercle plein) 1 (A), 7 (B) et 14 (C) jours après l'injection des billes. Les valeurs (exprimées en g de contraction) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 10 à 18 expériences séparées (voir Tableau X pour la valeur de n de chaque groupe d'animaux).



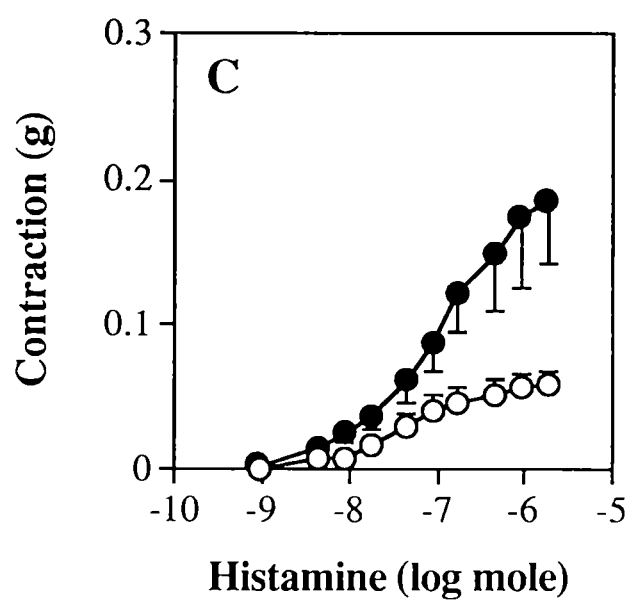
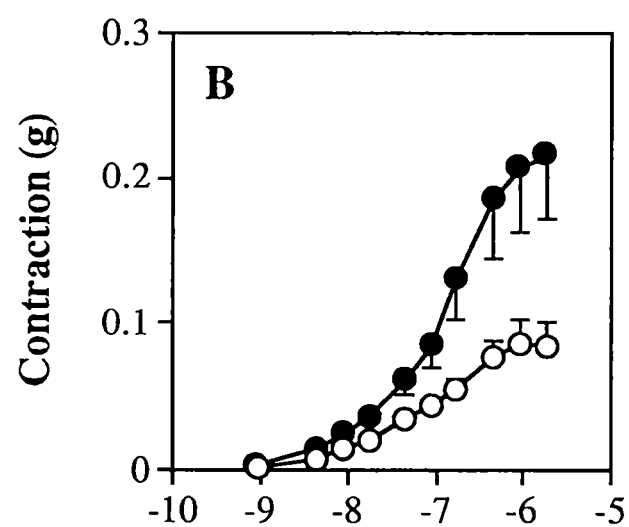
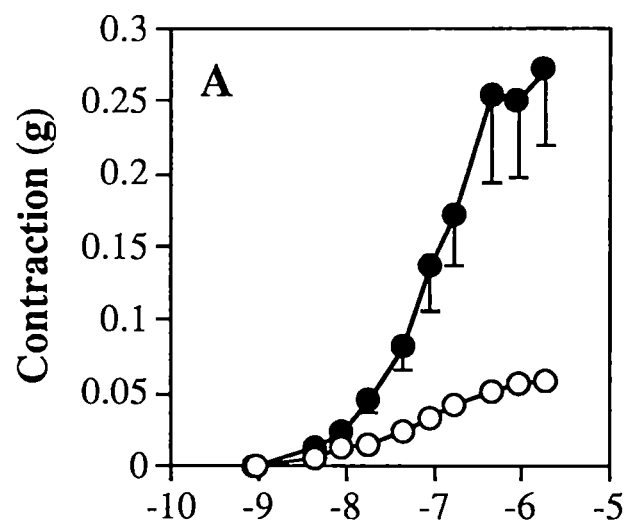


Figure 7: Courbes dose-réponses à l'acétylcholine de la bronche inférieure provenant de cobayes témoins (cercle vide) et injectés aux billes de Sephadex G-50 (cercle plein) 1 (**A**), 7 (**B**) et 14 (**C**) jours après l'injection des billes. Les valeurs (exprimées en g de contraction) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 10 à 18 expériences séparées (voir Tableau X pour la valeur de n de chaque groupe d'animaux).

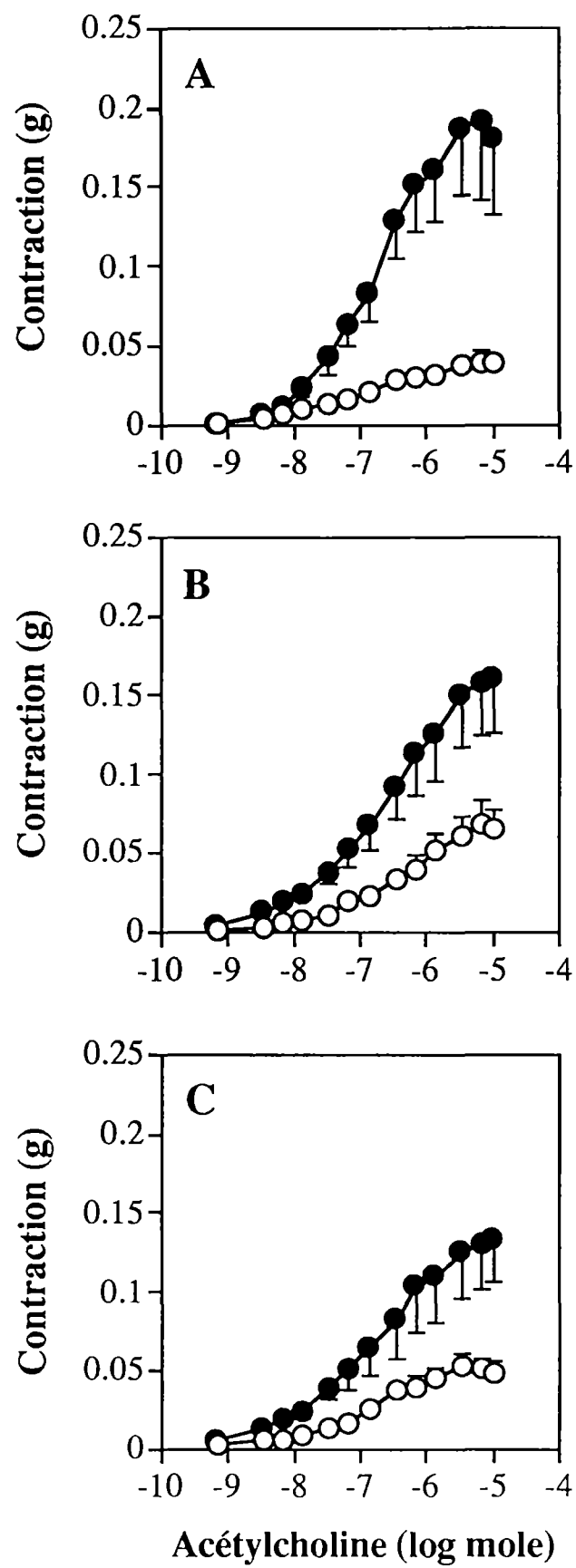


Tableau X: Valeurs des contractions maximales ( $E_{max}$ ) et des affinités apparentes ( $pD_2$ ) de la bronche inférieure pour l'histamine et l'acétylcholine provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex (24 mg/kg) 1, 7 et 14 jours après l'injection des billes.

	Jour	Groupe	Histamine	Acétylcholine
$E_{max} (g)$	1	T	$0.059 \pm 0.007 (14)$	$0.040 \pm 0.007 (14)$
		S	$0.271 \pm 0.052^{\dagger} (14)$	$0.191 \pm 0.049^{\dagger} (14)$
	7	T	$0.084 \pm 0.016 (16)$	$0.068 \pm 0.016 (16)$
		S	$0.207 \pm 0.044^{\dagger} (18)$	$0.158 \pm 0.034^{\dagger} (18)$
	14	T	$0.058 \pm 0.009 (10)$	$0.051 \pm 0.007 (10)$
		S	$0.186 \pm 0.044^{\dagger} (10)$	$0.130 \pm 0.028^{\dagger} (10)$
$pD_2$	1	T	$7.12 \pm 0.17 (14)$	$6.97 \pm 0.14 (14)$
		S	$6.92 \pm 0.08 (14)$	$6.84 \pm 0.17 (14)$
	7	T	$7.14 \pm 0.02 (16)$	$6.53 \pm 0.16 (16)$
		S	$6.93 \pm 0.06 (18)$	$6.68 \pm 0.09 (18)$
	14	T	$7.16 \pm 0.17 (10)$	$6.79 \pm 0.18 (10)$
		S	$7.08 \pm 0.14 (10)$	$6.79 \pm 0.17 (10)$

T: cobayes témoins    S: cobayes injectés aux billes de Sephadex G-50

$pD_2 = -\log ED_{50}$

Les valeurs des contractions maximales ( $E_{max}$ ; en g) et des affinités apparentes ( $pD_2$ ) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de (n) expériences séparées.  $^{\dagger}$ :  $P < 0.01$  en comparaison du groupe témoin (test t de Student pour des données non paires).

### 2.3.3 Parenchyme pulmonaire

L'injection des billes de Sephadex n'a pas augmenté la réactivité du parenchyme pulmonaire à l'histamine ou à l'acétylcholine 1 jour après l'injection des billes de Sephadex en comparaison des animaux témoins (Figures 8A et 9A). Cependant, 7 jours après l'injection des billes de Sephadex, le parenchyme pulmonaire a présenté une augmentation significative de 30 % et 60 % de la réactivité à l'histamine et à l'acétylcholine en comparaison du groupe témoin (Figures 8B et 9B) (Tableau XI). La réactivité du parenchyme pulmonaire à l'histamine et à l'acétylcholine a augmenté de 60 et 100 % respectivement 14 jours après l'injection des billes de Sephadex en comparaison du groupe témoin (Figures 8C et 9C) (Tableau XI). L'injection des billes de Sephadex n'a pas modifié l'affinité apparente du parenchyme pulmonaire envers les deux agents contractiles (Tableau XI).

Figure 8: Courbes dose-réponses à l'histamine du parenchyme pulmonaire provenant de cobayes témoins (cercle vide) et injectés aux billes de Sephadex G-50 (cercle plein) 1 (**A**), 7 (**B**) et 14 (**C**) jours après l'injection des billes. Les valeurs (exprimées en g de contraction) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 10 à 12 expériences séparées (voir Tableau XI pour la valeur de n de chaque groupe d'animaux).

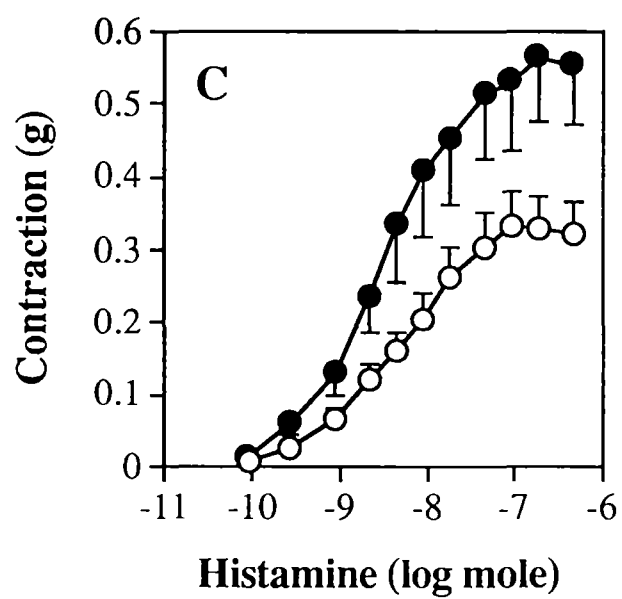
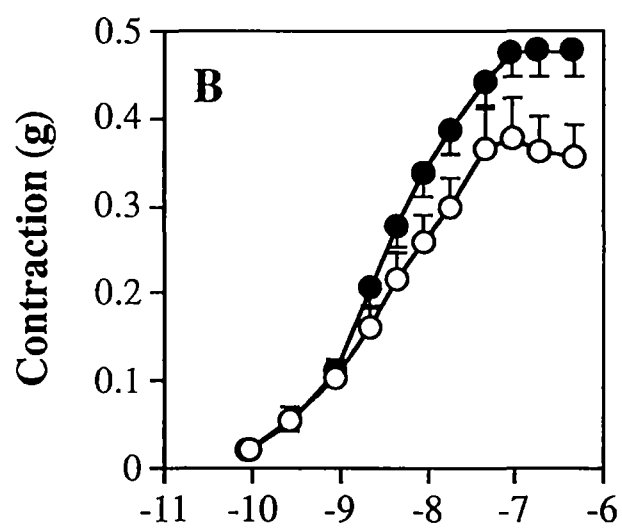
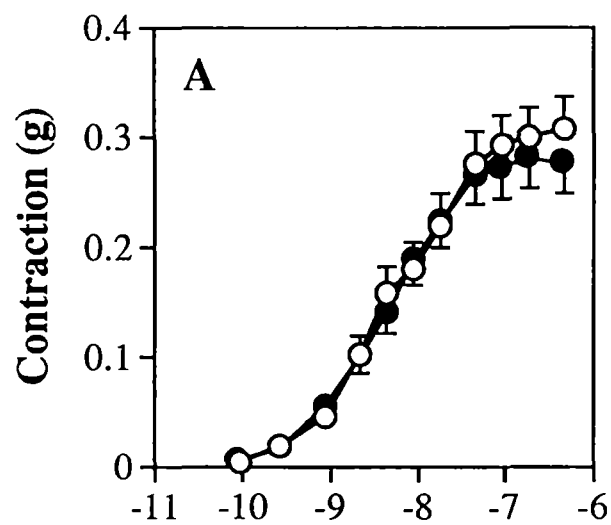


Figure 9: Courbes dose-réponses à l'acétylcholine du parenchyme pulmonaire provenant de cobayes témoins (cercle vide) et injectés aux billes de Sephadex G-50 (cercle plein) 1 (**A**), 7 (**B**) et 14 (**C**) jours après l'injection des billes. Les valeurs (exprimées en pourcentage de la contraction maximale du groupe témoin) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 11 à 12 expériences séparées (voir Tableau XI pour la valeur de n de chaque groupe d'animaux).



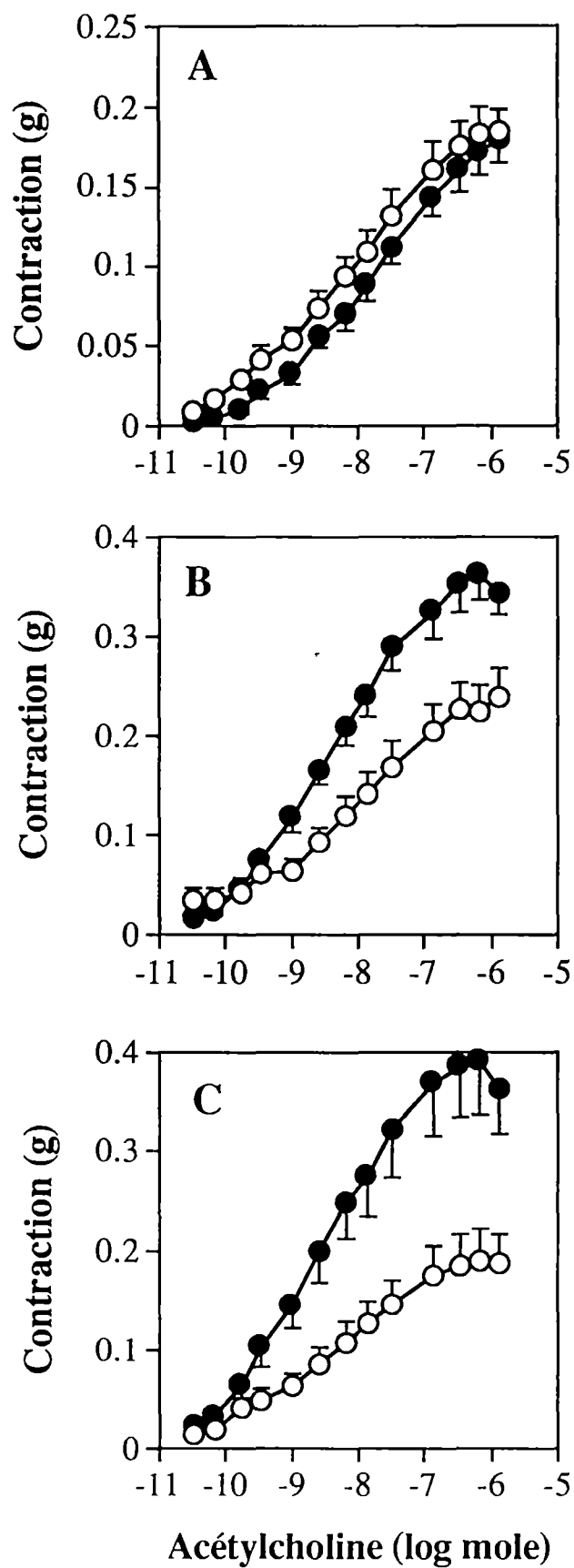


Tableau XI: Valeurs des contractions maximales ( $E_{max}$ ) et des affinités apparentes ( $pD_2$ ) du parenchyme pulmonaire pour l'histamine et l'acétylcholine provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex (24 mg/kg) 1, 7 et 14 jours après l'injection des billes.

	Jour	Groupe	Histamine	Acétylcholine
$E_{max} (g)$	1	T	$0.300 \pm 0.027 (11)$	$0.184 \pm 0.016 (11)$
		S	$0.281 \pm 0.027 (12)$	$0.172 \pm 0.015 (12)$
	7	T	$0.363 \pm 0.040 (12)$	$0.226 \pm 0.027 (12)$
		S	$0.476 \pm 0.027^{\dagger} (12)$	$0.362 \pm 0.026^{\dagger} (12)$
	14	T	$0.329 \pm 0.046 (12)$	$0.192 \pm 0.031 (12)$
		S	$0.565 \pm 0.090^{\dagger} (12)$	$0.386 \pm 0.052^{\dagger} (12)$
$pD_2$	1	T	$8.31 \pm 0.06 (11)$	$7.99 \pm 0.14 (11)$
		S	$8.42 \pm 0.05 (12)$	$7.81 \pm 0.14 (12)$
	7	T	$8.29 \pm 0.02 (12)$	$8.14 \pm 0.14 (12)$
		S	$8.37 \pm 0.06 (12)$	$8.21 \pm 0.08 (12)$
	14	T	$8.27 \pm 0.05 (12)$	$8.09 \pm 0.12 (12)$
		S	$8.36 \pm 0.08 (12)$	$8.16 \pm 0.10 (12)$

T: cobayes témoins S: cobayes injectés aux billes de Sephadex G-50

$pD_2 = -\log ED_{50}$

Les valeurs des contractions maximales ( $E_{max}$ ; en g) et des affinités apparentes ( $pD_2$ ) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de (n) expériences séparées.  $^{\dagger}$ :  $P < 0.05$  et  $^{\ddagger}$ :  $P < 0.01$  en comparaison du groupe témoin (test t de Student pour des données non paires).

## **2.4 Mesure du nombre apparent d'éosinophiles tissulaires et de l'activation des éosinophiles**

### **2.4.1 Bronches principales et inférieures**

La courbe d'étalonnage de la densité optique représentant l'activité peroxydase des éosinophiles en fonction du nombre d'éosinophiles (Figure 10) a permis de montrer que le nombre apparent d'éosinophiles a augmenté de 127, 133 et 138 % dans la bronche principale et de 75, 45 et 36 % dans la bronche inférieure 1, 7 et 14 jours après l'injection des billes de Sephadex en comparaison des animaux témoins (Tableau XII).

### **2.4.2 Activation des éosinophiles**

La courbe d'étalonnage de la densité optique en fonction de l'activité de la peroxydase de type I de Raifort (Figure 11) a permis de montrer que l'activité EPO totale retrouvée dans le LBA a augmenté de 10.2 fois, 1 jour après l'injection des billes de Sephadex en comparaison de l'activité retrouvée chez les animaux témoins (Tableau XIII). Cependant, 7 et 14 jours après l'injection des billes de Sephadex, l'activité EPO totale retrouvée dans le LBA est retournée près de la valeur déterminée chez les animaux témoins (Tableau XIII).

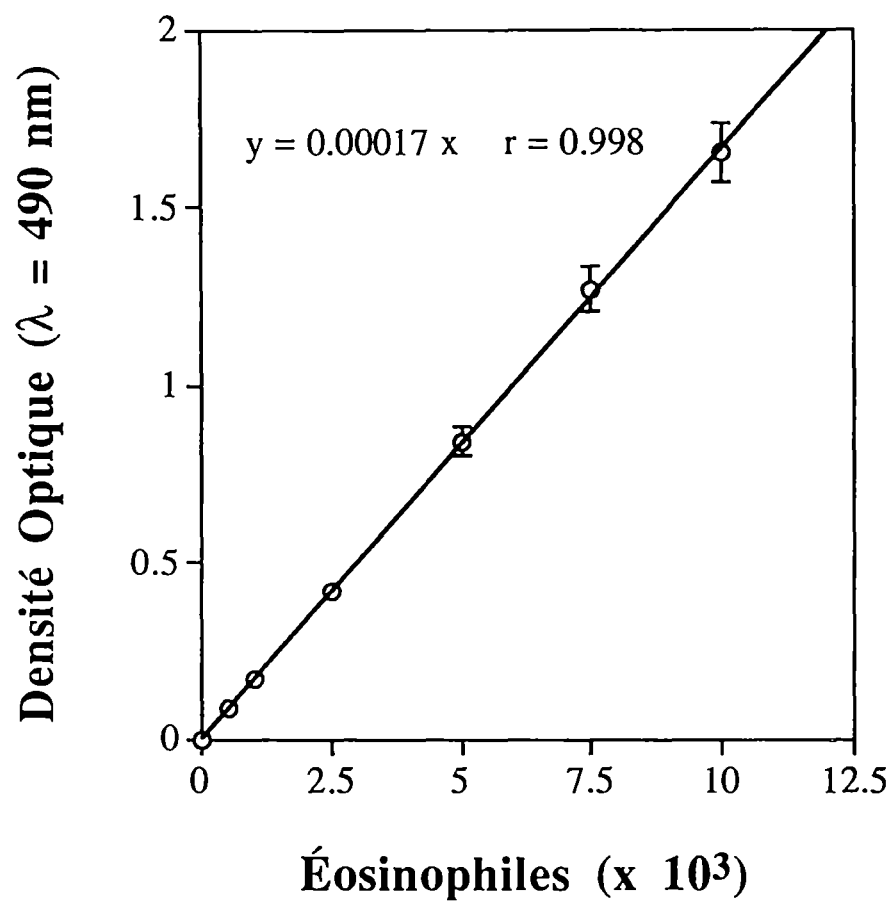


Figure 10: Courbe d'étalonnage de la densité optique représentant l'activité EPO des éosinophiles de cobayes en fonction du nombre d'éosinophiles purifiés. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 7 expériences séparées.

Tableau XII: Nombre apparent d'éosinophiles totaux retrouvés dans les bronches principales et inférieures provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 7 et 14 jours après l'injection des billes.

Nombre d'éosinophiles (x 10 <sup>3</sup> cellules)				
	Témoin	Jour 1	Jour 7	Jour 14
Bronches principales	20.18 ± 2.97 (6)	45.76 ± 2.10 <sup>†</sup> (6)	46.99 ± 3.36 <sup>†</sup> (5)	43.14 ± 1.80 <sup>†</sup> (6)
Bronches inférieures	82.55 ± 6.94 (5)	144.20 ± 11.44 <sup>†</sup> (5)	119.26 ± 3.10 <sup>†</sup> (6)	111.88 ± 2.35 <sup>†</sup> (6)

Les valeurs (x 10<sup>3</sup> cellules) représentent la moyenne ± S.E.M. des données obtenues de (n) expériences séparées. <sup>†</sup>: P < 0.05 et <sup>‡</sup>: P < 0.01 en comparaison du groupe témoin (test t de Student pour des données non paires).

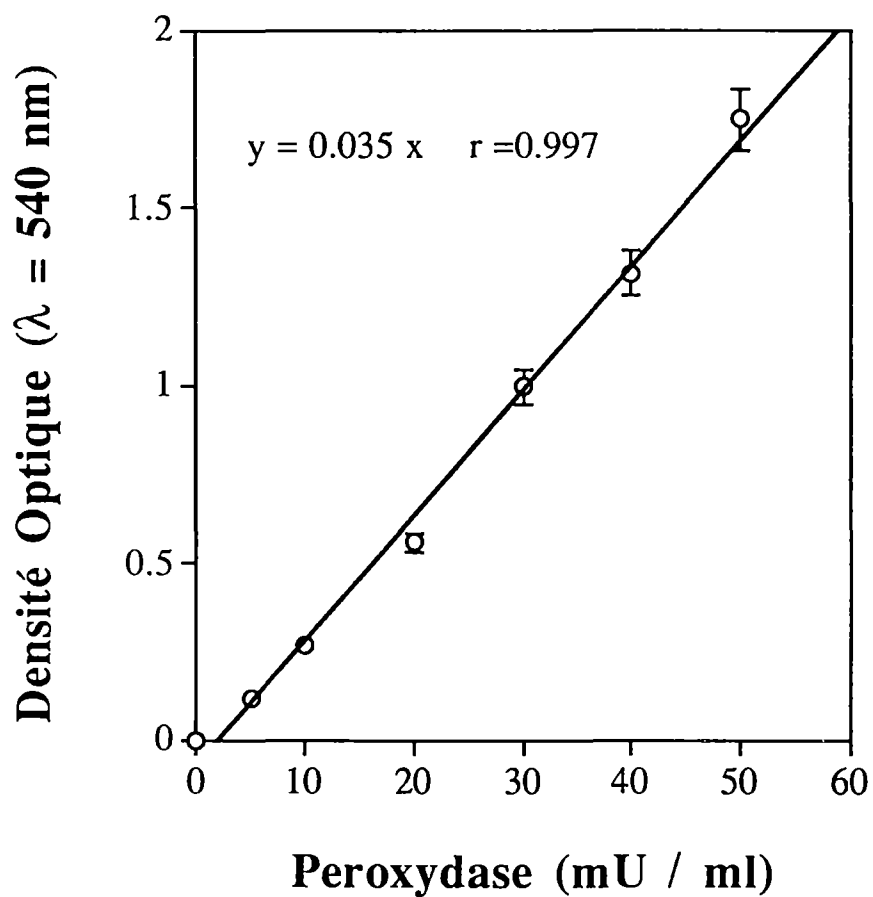


Figure 11: Courbe d'étalonnage de la densité optique en fonction du nombre d'unité de peroxydase de raifort. Les valeurs (en absorbance) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 7 expériences séparées.

Tableau XIII:      Activité EPO totale retrouvée dans le LBA provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 7 et 14 jours après l'injection des billes.

	Témoin	Jour 1	Jour 7	Jour 14
Activité	$9.62 \pm 2.41$	$97.78 \pm 9.63^{\dagger}$	$14.37 \pm 2.08$	$12.16 \pm 2.18$
peroxydase totale	(5)	(6)	(8)	(4)
(mU)				

Les valeurs (mU) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de (n) expériences séparées.  $^{\dagger}$ :  $P < 0.01$  en comparaison du groupe témoin (test t de Student pour des données non paires).

## **2.5 Étude histologique**

### **2.5.1 Bronche principale**

La bronche principale provenant de cobaye témoin a présenté un épithélium bronchique intact avec quelques éosinophiles résidants dans la muqueuse et la sous-muqueuse (Figure 12A gauche). Un jour après l'injection des billes de Sephadex, la bronche principale a présenté des caractéristiques histologiques similaires à celles des cobayes témoins (Figure 12A droite). Une infiltration d'éosinophiles a été observée au niveau du cartilage de la bronche principale 1 jour après l'injection des billes de Sephadex, cependant, les éosinophiles n'ont pas migré vers la sous-muqueuse 7 ou 14 jours après l'injection des billes (résultats non montrés). La bronche principale provenant d'animaux injectés aux billes de Sephadex n'a pas présenté de changement morphologique 7 et 14 jours après l'injection en comparaison des animaux au jour 1 (Tableau XIV).

### **2.5.2 Bronche inférieure**

Une infiltration importante d'éosinophiles a été observée dans la muqueuse et la sous-muqueuse de la bronche inférieure, 1 jour après l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye (Figure 12B droite) en comparaison des animaux témoins (Figure 12B gauche). La population d'éosinophiles présents dans la muqueuse et la sous-muqueuse semblait diminuer 7 et 14 jours après l'injection des billes, cependant, elle est restée supérieure à celle observée chez les animaux témoins (Tableau XIV).



Figure 12: Microscopie optique de la bronche externe (**A**) et de la bronche inférieure (**B**) représentatives d'un cobaye témoin (*photographie de gauche*) et d'un cobaye 1 jour après l'injection des billes de Sephadex (*photographie de droite*). Agrandissement: x 225 (**A**) et (**B**). Coloration éosine-hématoxyline. E: éosinophile; Ep: épithélium; ML: muscle lisse.

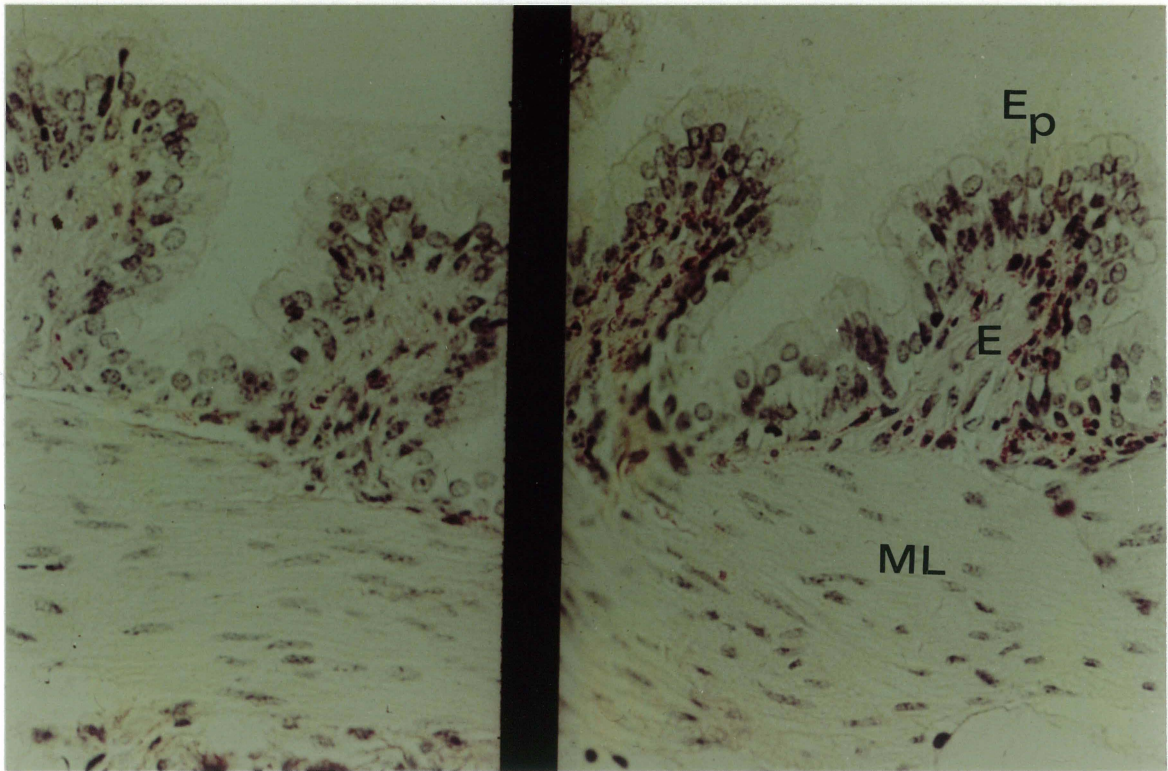
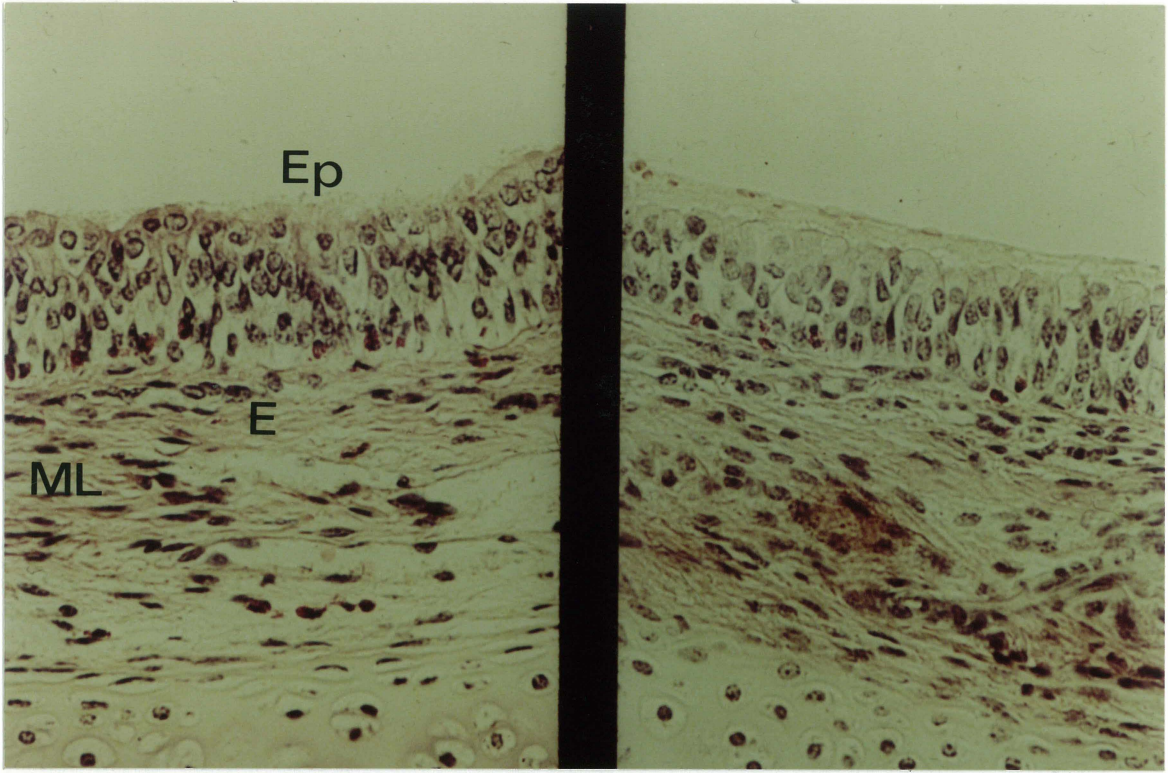


Tableau XIV: Résumé des principales manifestations histopathologiques et de la réactivité bronchique observées au niveau de la bronche principale et de la bronche inférieure provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 7 et 14 jours après l'injection.

Tissu	Groupe	eosinophiles		Épithélium bronchique	HRB
		muqueuse	sous-muqueuse		
Bronche principale	T	+	+	I	-
	1	+	+	I	-
	7	+	+	I	-
	14	+	+	I	-
Bronche inférieure	T	+	+	I	-
	1	++	++++	I	+++
	7	++	+++	I	+++
	14	++	++	I	+++

T: témoin                      1, 7 et 14: jour après l'injection des billes de Sephadex  
 +++: important              ++: moyen              +: faible              -: absent              I: intact  
 HRB: hyperréactivité bronchique              Évaluations réalisées chez 3 à 5 cobayes

Aucune évidence histologique d'un endommagement de l'épithélium bronchique n'a été observée aux divers temps suivant l'injection des billes de Sephadex (Figure 12B droite; Tableau XIV).

### **2.5.3 Parenchyme pulmonaire**

Une infiltration importante d'éosinophiles a été observée au niveau du parenchyme pulmonaire, dans l'interstice alvéolaire et dans le tissu péribronchique, 1 jour après l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye (Figure 14A) en comparaison des animaux témoins (Figure 13). Cependant, les éosinophiles présents autour des bronches n'ont pratiquement pas infiltré la sous-muqueuse ou la muqueuse, 1 jour après l'injection des billes (Figure 14B); très peu d'éosinophiles ont été retrouvés dans l'épithélium bronchique des cobayes témoins (Figure 13). Sept jours après l'injection des billes de Sephadex, les éosinophiles précédemment décrits autour des bronchioles semblaient infiltrer la muqueuse et la sous-muqueuse des bronches (Figure 15A). Les éosinophiles furent toujours présents dans l'épithélium bronchique 14 jours après l'injection des billes de Sephadex (Tableau XV). Aucune évidence histologique d'un endommagement de l'épithélium bronchique n'a été observée aux divers temps suivant l'injection des billes de Sephadex (Figures 14B et 15A; Tableau XV). La formation de corps granulomateux (cellules mononucléaires organisées en structures concentriques probablement autour d'une bille de Sephadex) a été aussi observée 1 jour après l'injection des billes de Sephadex (Figure 14A). Les granulomes furent toujours présents aux jours 7 (Figure 15B) et 14 après l'injection (Tableau XV).



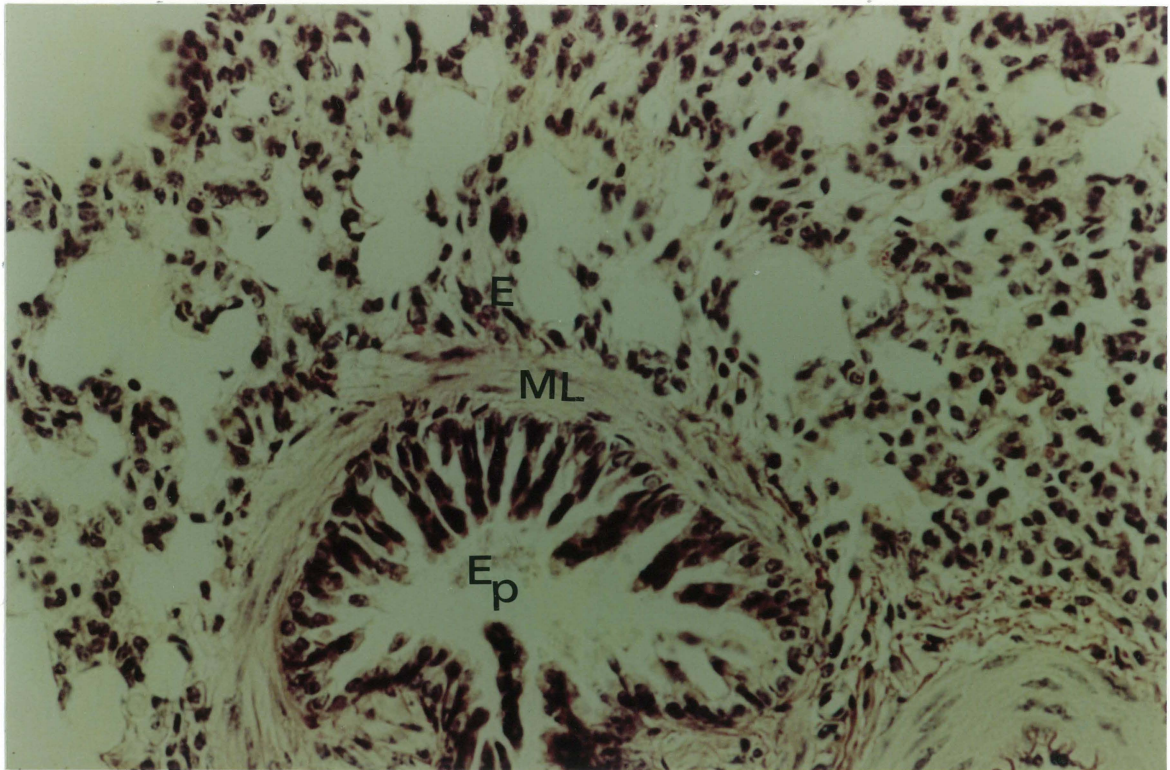


Figure 13: Microscopie optique du parenchyme pulmonaire et d'une bronche intrapulmonaire représentatif d'un cobaye témoin 1 jour après l'injection de saline stérile et apyrogène. Agrandissement: x 225. Coloration éosine-hématoxyline. E: éosinophiles; Ep: épithélium; ML: muscle lisse.

Figure 14: Microscopie optique du parenchyme pulmonaire (**A**) et d'une bronche intrapulmonaire (**B**) représentatifs d'un cobaye injecté aux billes de Sephadex 1 jour après l'injection des billes. Agrandissement: x 225 (**A**) et x 300 (**B**). Coloration éosine-hématoxyline. E: éosinophiles; Ep: épithélium, CG: corps granulomateux.



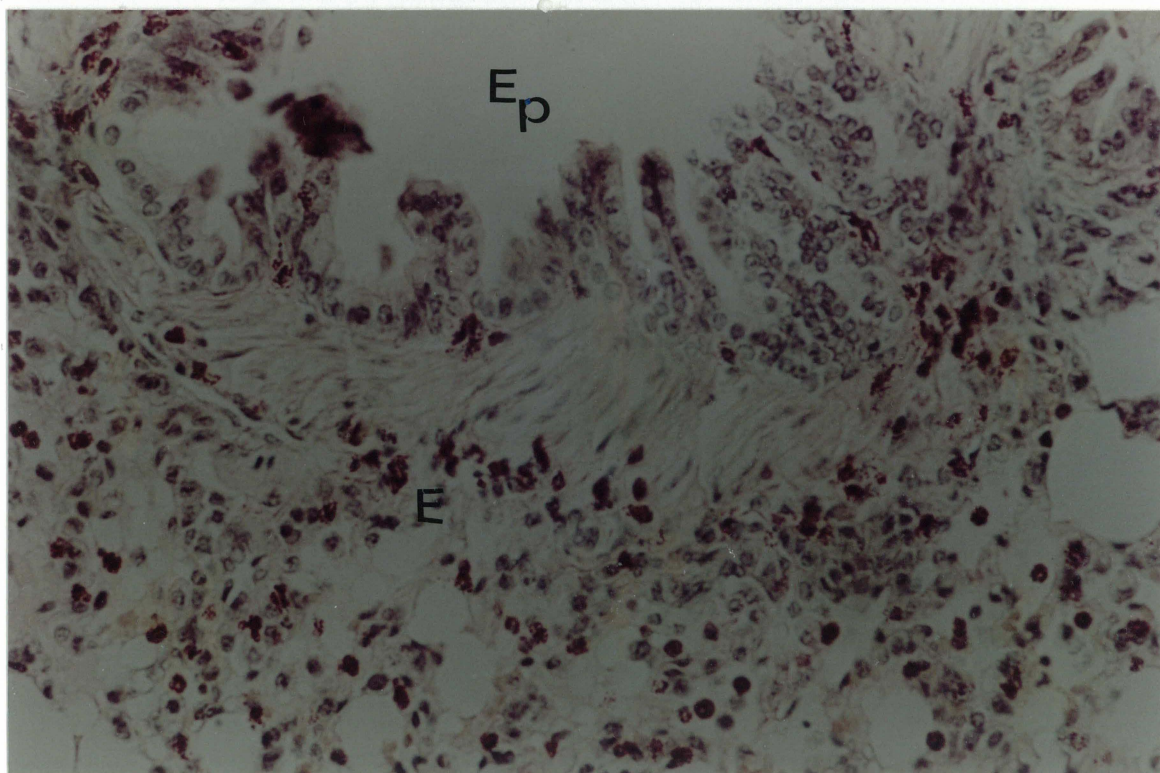
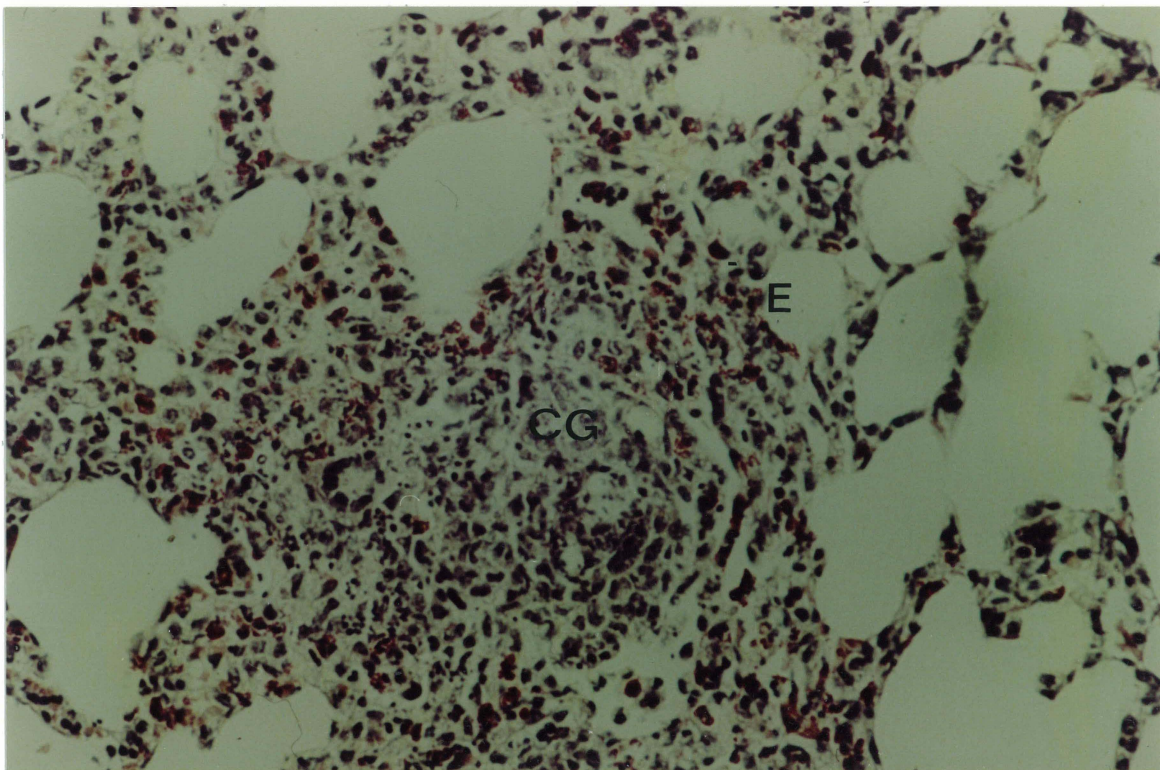


Figure 15: Microscopie optique d'une bronche intrapulmonaire (**A**) et du parenchyme pulmonaire (**B**) représentatifs d'un cobaye injecté aux billes de Sephadex 7 jours après l'injection des billes. Agrandissement: x 300 (**A**) et x 225 (**B**). Coloration éosine-hématoxyline. E: éosinophiles; Ep: épithélium bronchique; ML: muscle lisse; CG: corps granulomateux.



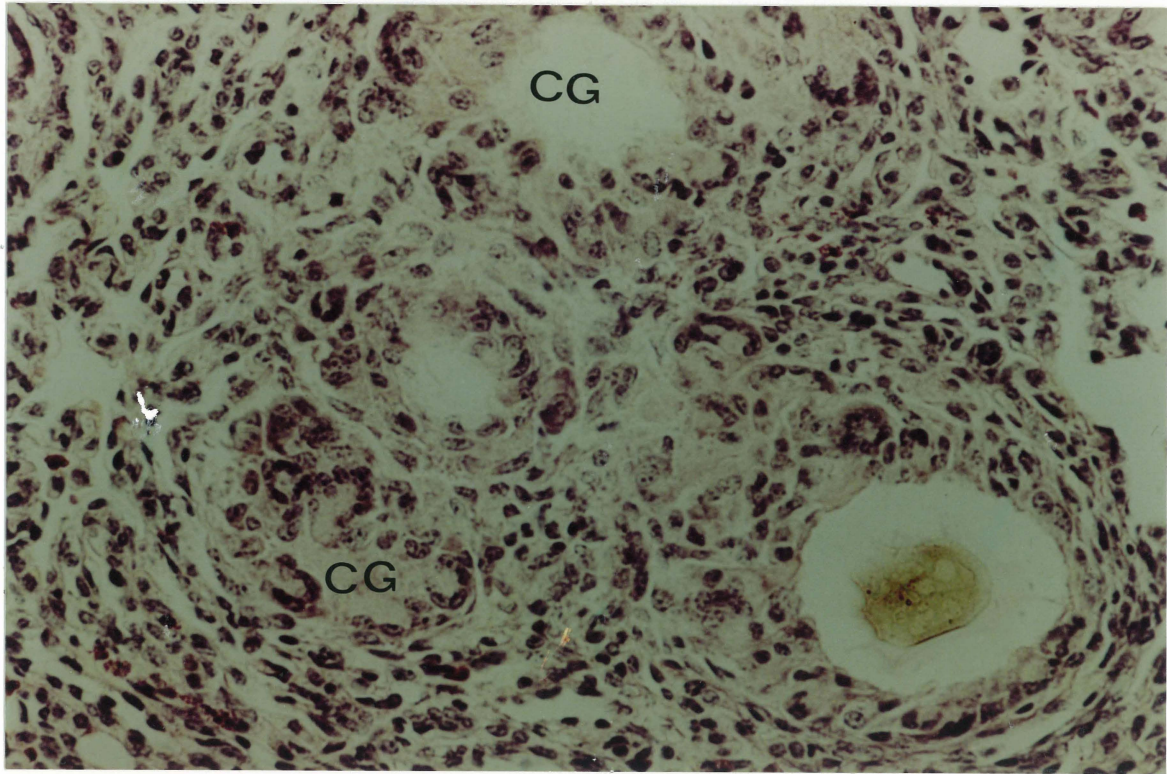
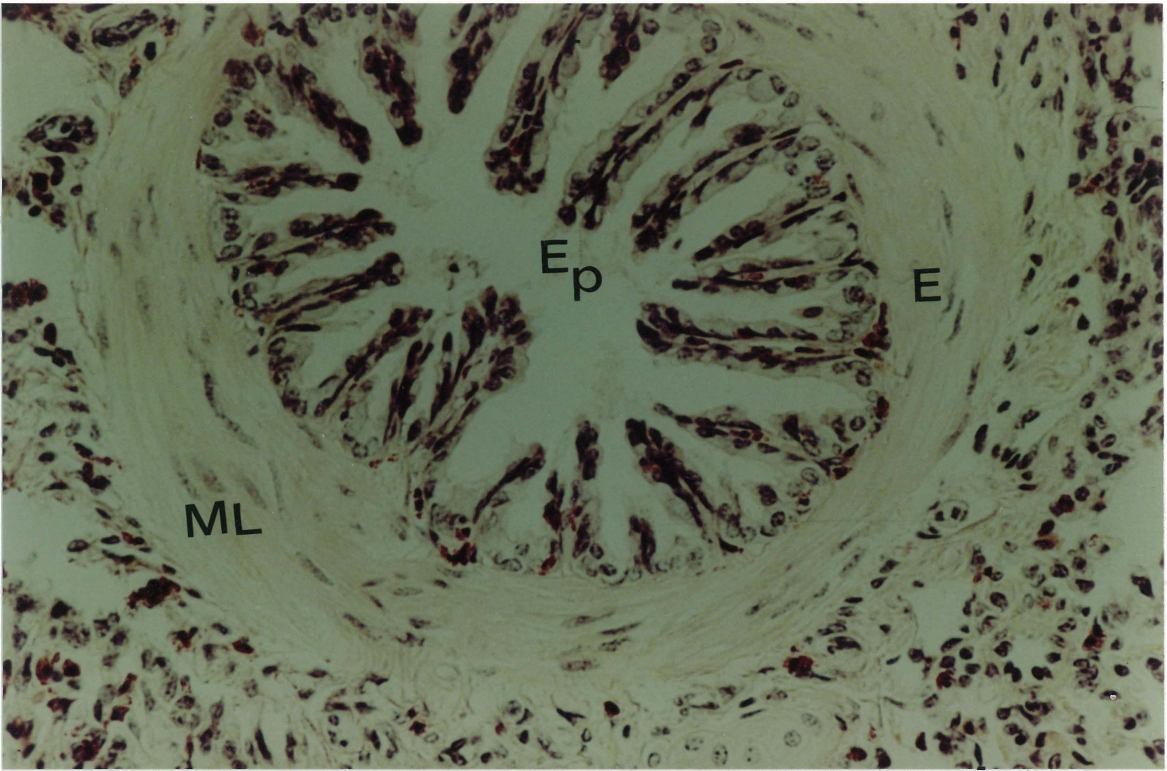


Tableau XV: Résumé des principales manifestations histopathologiques et de la réactivité bronchique observées au niveau du parenchyme pulmonaire provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex G-50 1, 7 et 14 jours après l'injection.

Groupe	Éosinophiles		Ép	CG	HRB
	parenchyme	bronchiole			
		sous-muqueuse muqueuse			
T	+	±	-	I	-
1	+++++	±	±	I	-
7	++++	+++	++	I	+
14	+++	+++	++	I	++

T: témoin 1, 7 et 14: jours après l'injection des billes de Sephadex

++++: très important +++: important ++: moyen +: faible -: absent I: intact

HRB: hyperréactivité bronchique CG: corps granulomateux

Ép: épithélium bronchique Évaluations réalisées chez 3 à 5 cobayes

### **3 CINÉTIQUE DE L'INFLAMMATION PULMONAIRE ET DE L'HRB CHEZ LE COBAYE INJECTÉ AUX BILLES DE SEPHADEX**

Les résultats de cette première partie de l'étude suggèrent que chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex, l'infiltration des éosinophiles dans la muqueuse et la sous-muqueuse des voies aériennes sembleraient être associée à l'augmentation de la réponse contractile de ces tissus à divers spasmogènes. Dans le but de vérifier cette hypothèse, les divers phénomènes étudiés précédemment ont été mesurés à des temps plus courts (1, 3, 6 et 12 hrs après l'injection). Le tissu cible pour l'étude de l'HRB fut la bronche inférieure puisque cette dernière a présenté une hyperréactivité 24 hrs après l'injection des billes de Sephadex.

#### **3.1 Cinétique de l'HRB**

L'injection des billes de Sephadex chez le cobaye conscient a induit aucune augmentation de la réactivité *ex vivo* de la bronche inférieure à l'histamine (Figure 16) ou à l'acétycholine 1 h après l'injection (Tableau XVI). Cependant, 3 hrs après l'injection des billes de Sephadex la réactivité de la bronche inférieure à l'histamine a augmenté de 84 %. L'HRB a diminué un peu 6 hrs après l'injection des billes en comparaison de 3 hrs mais elle fut maximale à 12 hrs (165 % d'augmentation en comparaison du groupe témoin 12 hrs) (Figure 16; Tableau XVI). Tel que montré précédemment, l'HRB fut toujours présente 24 hrs après l'injection des billes de Sephadex (Figure 16; Tableau XVI).

Figure 16: Courbes dose-réponses à l'histamine de la bronche inférieure provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection (voir l'encadré pour la légende des courbes). Les valeurs (exprimées en g de contraction) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 11 à 12 expériences séparées (voir Tableau XVI pour la valeur de n de chaque groupe d'animaux). Pour simplifier le graphique la courbe du groupe d'animaux témoins correspond à la réponse de la bronche inférieure provenant d'animaux 24 hrs après l'injection de saline stérile et apyrogène. Les valeurs de la réactivité ( $E_{max}$ ) de la bronche inférieure des autres groupes d'animaux témoins aux différents temps de l'étude est résumée au tableau XVI.

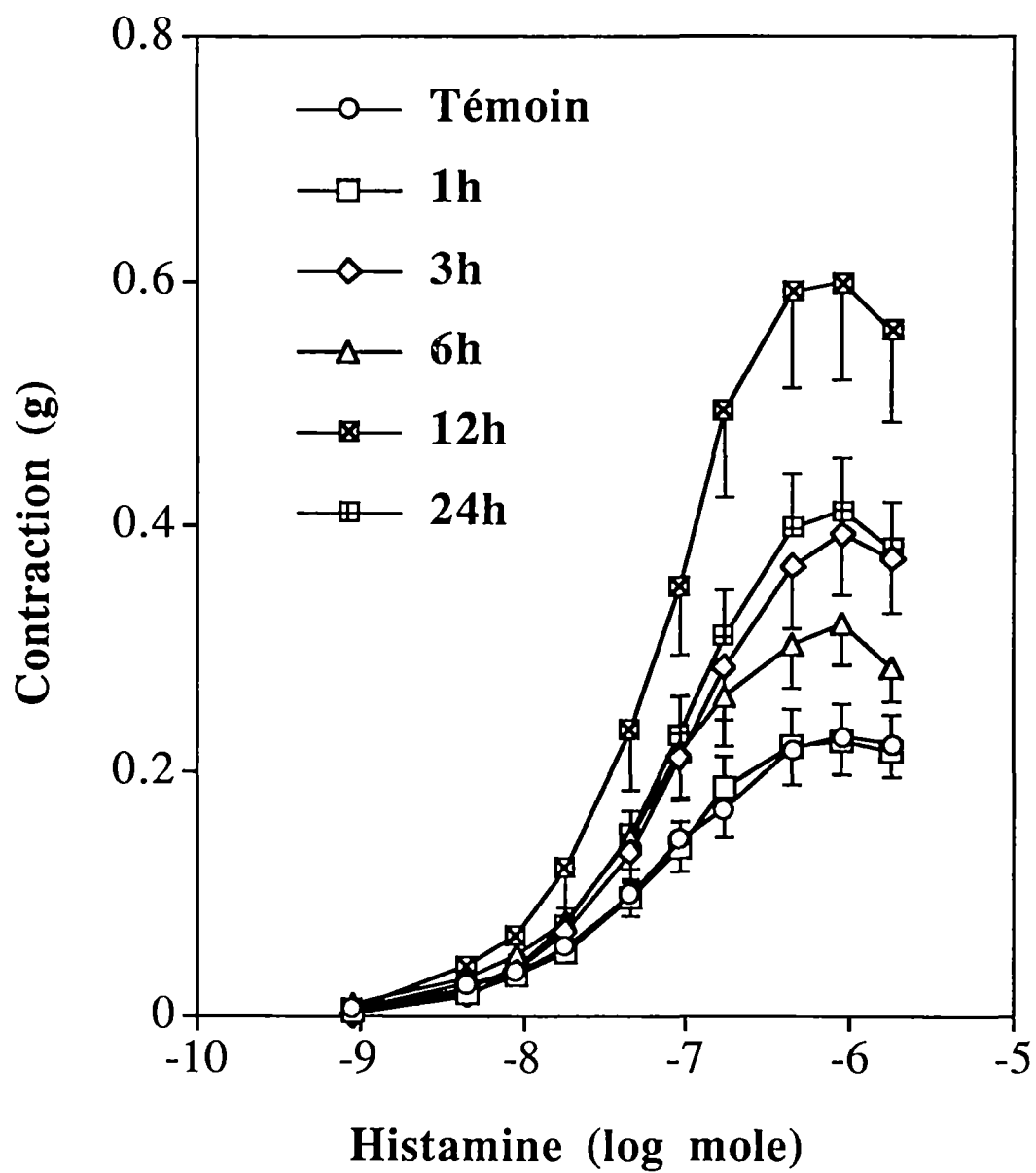


Tableau XVI: Valeurs des contractions maximales (en g de contraction) à l'histamine et à l'acétylcholine de la bronche inférieure provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex, 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection.

Temps	Emax (g)			
	Histamine		Acétylcholine	
	Témoin	Sephadex	Témoin	Sephadex
1	$0.195 \pm 0.044$ (8)	$0.224 \pm 0.031$ (16)	$0.154 \pm 0.031$ (8)	$0.194 \pm 0.027$ (16)
3	$0.222 \pm 0.03$ (15)	$0.394 \pm 0.051^{\dagger}$ (14)	N.D.	N.D.
6	$0.228 \pm 0.030$ (14)	$0.320 \pm 0.033^{\dagger}$ (15)	N.D.	N.D.
12	$0.230 \pm 0.026$ (16)	$0.610 \pm 0.081^{\ddagger}$ (18)	$0.181 \pm 0.02$ (16)	$0.429 \pm 0.062^{\ddagger}$ (18)
24	$0.180 \pm 0.017$ (17)	$0.413 \pm 0.042^{\ddagger}$ (20)	$0.152 \pm 0.013$ (17)	$0.314 \pm 0.029^{\ddagger}$ (20)

Les valeurs (en g de contraction) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de (n) expériences séparées.  $^{\dagger}$ :  $P < 0.05$  et  $^{\ddagger}$ :  $P < 0.01$  en comparaison du groupe témoin (test t de Student pour des données non pairées).

### **3.2 Cinétique de l'éosinophilie sanguine**

Trois heures après l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye, le nombre de leucocytes totaux a augmenté de 2.4 fois en comparaison des animaux témoins (injection intraveineuse de saline et sacrifice des cobayes 24 hrs après) (Figure 17A). Le nombre de leucocytes totaux a diminué 6 hrs après l'injection des billes mais est retournée près du nombre retrouvé chez les animaux témoins, 24 hrs après l'injection (Figure 17A). Tel que montré à la figure 17B, la cinétique du nombre d'éosinophiles sanguins a montré un profil biphasique avec une augmentation maximale de 7.2 et 4.6 fois, 3 et 12 hrs respectivement après l'injection des billes de Sephadex en comparaison du nombre d'éosinophiles mesurés chez les animaux témoins. L'éosinophilie fut maintenue 24 hrs après l'injection des billes (Figure 17B).

### **3.3 Cinétique de l'accumulation des cellules inflammatoires dans le LBA**

Six heures après l'injection des billes, le nombre de cellules totales retrouvées dans le LBA a augmenté et a atteint un maximum 24 hrs après (Table XVII). Le nombre de macrophages retrouvés dans le LBA a diminué de 37.5 % ( $P < 0.05$ ) 1 hr après l'injection des billes (Figure 18A) mais a augmenté de 1.9, 2.1 et 2.9 fois, 6, 12 et 24 hrs respectivement après l'injection des billes en comparaison des animaux témoins (injection intraveineuse de saline et sacrifice des cobayes 24 hrs après) (Figure 18A).

Figure 17: Nombre de leucocytes totaux (**A**) et d'éosinophiles (**B**) contenus dans le sang de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection. Les valeurs (cellules/mm<sup>3</sup>) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 4 à 9 expériences séparées. \*:  $P < 0.05$  et \*\*:  $P < 0.01$  en comparaison du groupe témoin (test t de Student pour des données non pairées).



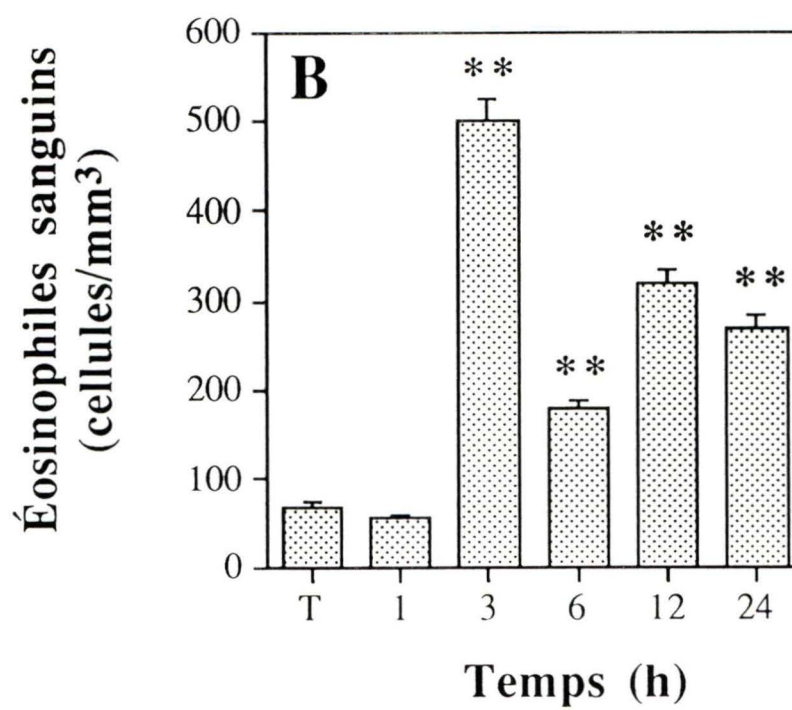
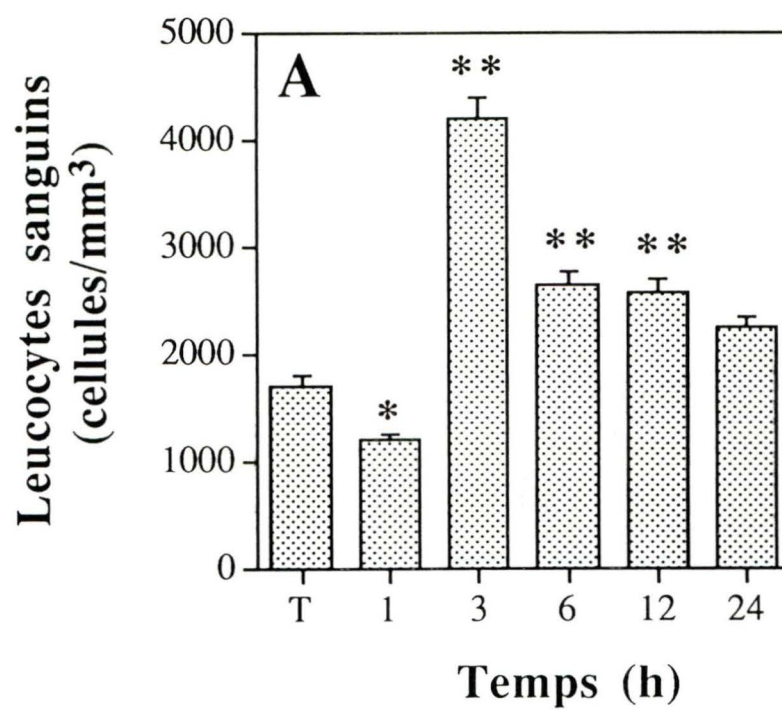


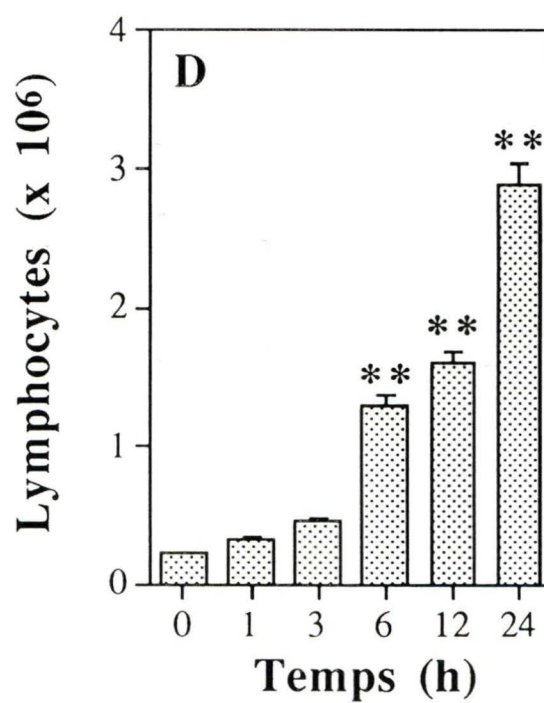
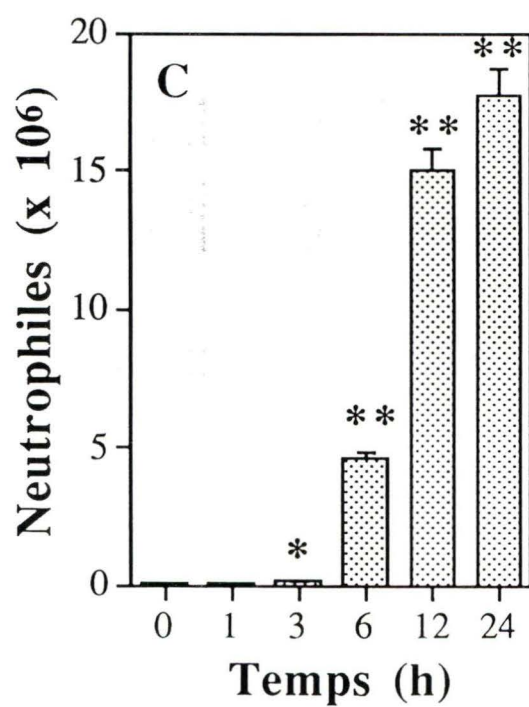
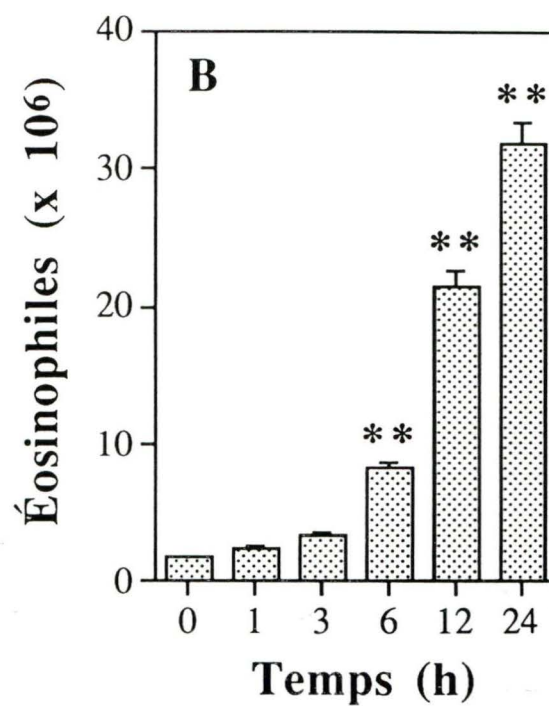
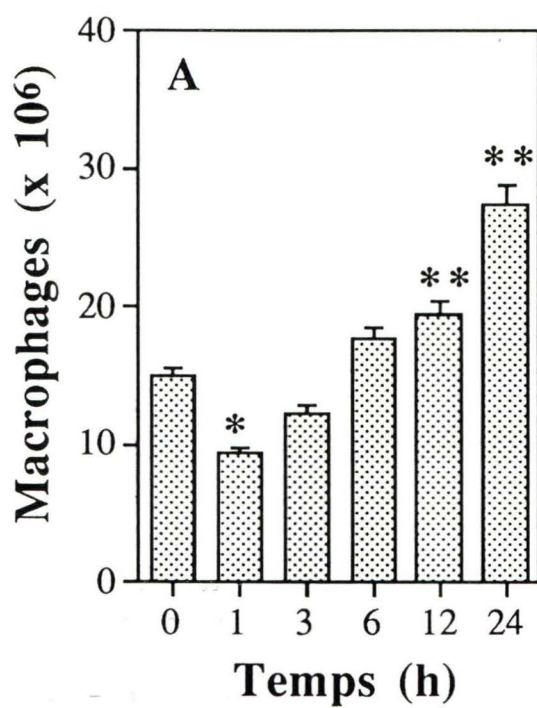
Tableau XVII: Nombre de leucocytes totaux ( $\times 10^6$  cellules) retrouvés dans le LBA des animaux témoins et injectés aux billes de Sephadex.

Témoin	Temps (hrs)				
	1	3	6	12	24
$18.72 \pm 1.01$	$13.41 \pm 1.46^{\dagger}$	$19.46 \pm 3.16$	$31.74 \pm 1.95^{\ddagger}$	$57.60 \pm 7.34^{\ddagger}$	$76.32 \pm 3.14^{\ddagger}$
(9)	(4)	(6)	(6)	(9)	(9)

<sup>a</sup>Le nombre de cellules est déterminé à l'aide d'un hématimètre et la viabilité cellulaire est toujours supérieure à 90 % (test d'exclusion du bleu de Trypan).

Les valeurs ( $\times 10^6$  cellules) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de (n) expériences séparées.  $^{\dagger}$ :  $P < 0.05$  et  $^{\ddagger}$ :  $P < 0.01$  en comparaison du groupe témoin (test t de Student pour des données non paires).

Figure 18: Nombre de macrophages (**A**), d'éosinophiles (**B**), de neutrophiles (**C**) et de lymphocytes (**D**) contenus dans le LBA de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection des billes. Les valeurs ( $\times 10^6$  cellules) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 4 à 9 expériences séparées. \*:  $P < 0.05$  et \*\*:  $P < 0.01$  en comparaison du groupe témoin (test t de Student pour des données non pairées).



Le nombre d'éosinophiles a augmenté de 4.7, 12 et 18 fois, 6, 12 et 24 hrs respectivement après l'injection des billes de Sephadex (Figure 18B). Le nombre de neutrophiles dans le LBA des animaux témoins fut très faible ( $0.05 \pm 0.02 \times 10^6$  cellules); cette population cellulaire n'a pas augmenté 1 hr après l'injection ( $0.016 \pm 0.006 \times 10^6$  cellules). Une augmentation significative du nombre de neutrophiles fut obtenue 3 hrs après l'injection des billes ( $0.27 \pm 0.04 \times 10^6$  cellules); cette population cellulaire augmente de 66, 215 et 254 fois, 6, 12 et 24 hrs respectivement après l'injection des billes de Sephadex en comparaison des animaux témoins (Figure 18C). Finalement, la population de lymphocytes retrouvés dans le LBA provenant des animaux injectés aux billes de Sephadex a augmenté de 6.9, 7.3 et 13.2 fois, 6, 12 et 24 hrs respectivement après l'injection en comparaison des animaux témoins (Figure 18D).

### **3.4 Nombre d'éosinophiles présents dans les voies aériennes**

Le nombre apparent d'éosinophiles contenus dans la bronche inférieure, tel qu'évalué par la mesure de l'activité EPO retrouvée dans le tissu, a augmenté de 53, 33 et 65 %, 6, 12 et 24 hrs respectivement après l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye (Tableau XVIII). Au niveau de la bronche principale, une augmentation du nombre d'éosinophiles fut obtenue uniquement 24 hrs après l'injection des billes (Tableau XVIII).

Tableau XVIII: Nombre apparent d'éosinophiles contenus dans la bronche inférieure et la bronche principale provenant de cobaye témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection des billes.

Temps (hr)	Nombre d'éosinophiles ( $\times 10^3$ cellules)	
	Bronche inférieure	Bronche principale
Témoin	$85.04 \pm 7.93$ (5)	$20.88 \pm 3.53$ (5)
1	$92.76 \pm 6.10$ (5)	$22.01 \pm 3.30$ (5)
3	$100.35 \pm 8.24$ (5)	$20.12 \pm 2.33$ (4)
6	$130.42 \pm 6.24^\dagger$ (5)	$24.33 \pm 1.50$ (6)
12	$113.05 \pm 6.40^\dagger$ (4)	$18.87 \pm 2.35$ (4)
24	$140.68 \pm 14.05^\ddagger$ (4)	$45.07 \pm 2.56^\ddagger$ (4)

Les valeurs ( $\times 10^3$  cellules) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de (n) expériences séparées.  $^\dagger$ :  $P < 0.05$  et  $^\ddagger$ :  $P < 0.01$  en comparaison du groupe témoin (test t de Student pour des données non paires). Le nombre apparent d'éosinophiles a été évalué par la mesure de l'activité EPO retrouvée dans la bronche inférieure.

### 3.5 Activation des éosinophiles

Tel que montré au tableau XIX, l'activité EPO totale retrouvée dans le LBA a augmenté de 5.3, 13.6 et 11.3 fois, 6, 12 et 24 hrs respectivement après l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye.

Tableau XIX:      Activité EPO totale retrouvée dans le LBA des cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection.

Activité peroxidase totale (mU)					
Temps (hr)					
Témoin	1	3	6	12	24
$9.05 \pm 2.05$	$5.55 \pm 1.92$	$12.57 \pm 2.69$	$48.42 \pm 5.70^{\dagger}$	$123.43 \pm 10.60^{\dagger}$	$102.40 \pm 11.52^{\dagger}$
(6)	(4)	(4)	(8)	(6)	(7)

Les valeurs (en mU) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de (n) expériences séparées.  $^{\dagger}$ :  $P < 0.01$  en comparaison du groupe témoin (test t de Student pour des données non pairées).

## **4 ÉTUDE DES AUTRES MÉCANISMES POTENTIELLEMENT RESPONSABLES DE L'HRB**

Nous avons étudié, par la suite, quel étaient les autres événements inflammatoires présents chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex.

### **4.1 Implication des neutrophiles**

Les doses de 3.86 et 0.43 mg/kg de billes, qui ont provoqué une infiltration plus faible de neutrophiles (Figure 3) 24 hrs après l'injection, ont été administrées à l'animal afin d'évaluer la participation des neutrophiles dans le développement de l'HRB. L'injection de ces deux doses a induit une réponse exagérée de la bronche inférieure à l'histamine similaire à celle obtenue avec la dose de 24 mg/kg (Figure 19).

### **4.2 Libération de la $\beta$ -glucuronidase**

La figure 20 montre la courbe d'étalonnage de la densité optique en fonction de la quantité de phénolphthaléine. Tel que montré au tableau XX, l'activité  $\beta$ -glucuronidase totale retrouvée dans le LBA a diminué de 72 % ( $P < 0.05$ ) 1 hr après l'injection et augmente de 2.8, 3.5 et 4.2 fois, 6, 12 et 24 hrs après l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye. Cependant, 7 et 14 jours (168 et 386 hrs respectivement) après l'injection des billes de Sephadex l'activité  $\beta$ -glucuronidase totale retrouvée dans le LBA est retournée près des niveaux mesurés chez les animaux témoins (Tableau XX).



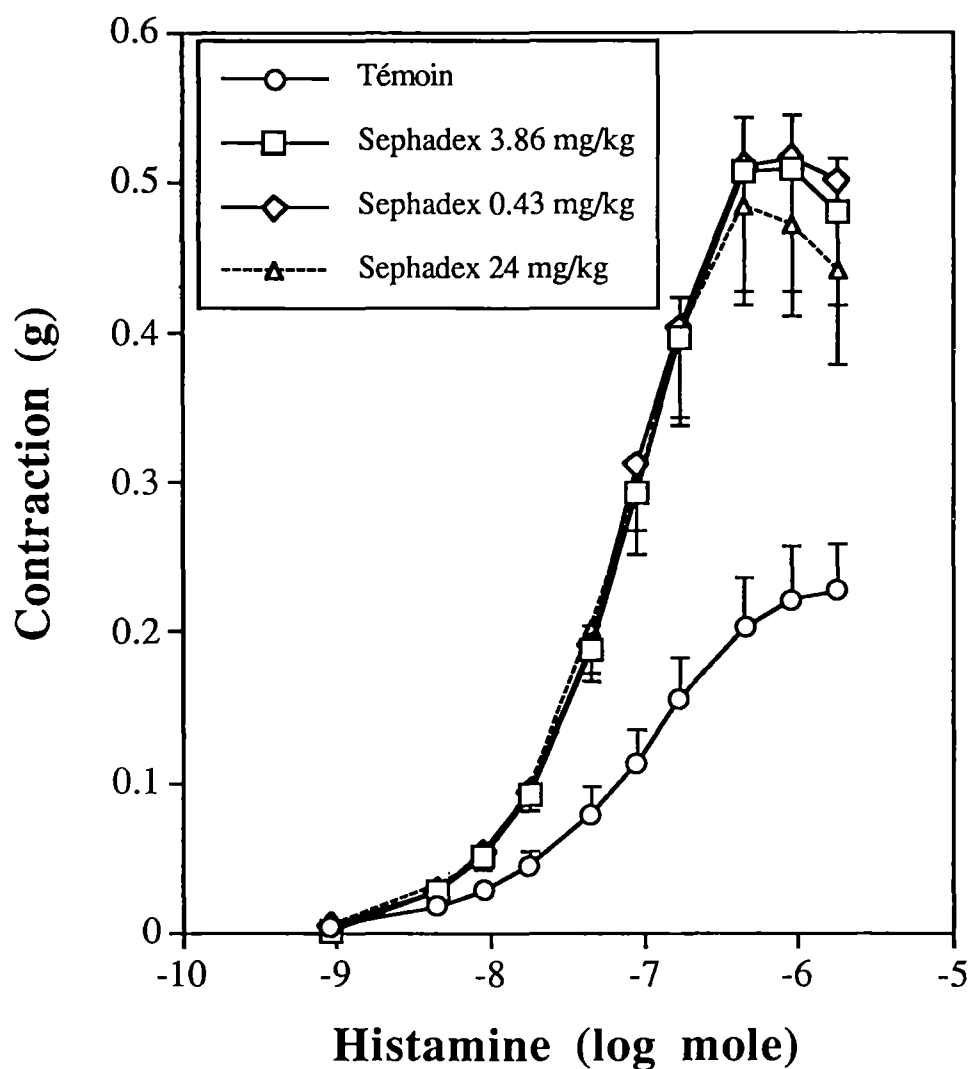


Figure 19: Courbes dose-réponses à l'histamine de la bronche inférieure provenant de cobayes témoins et injectés avec des doses de 0.43, 3.86 ou 24 mg/kg de billes de Sephadex 24 hrs après l'injection (voir l'encadré pour la légende des courbes). Les valeurs (exprimées en g de contraction) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 12 à 16 expériences séparées.

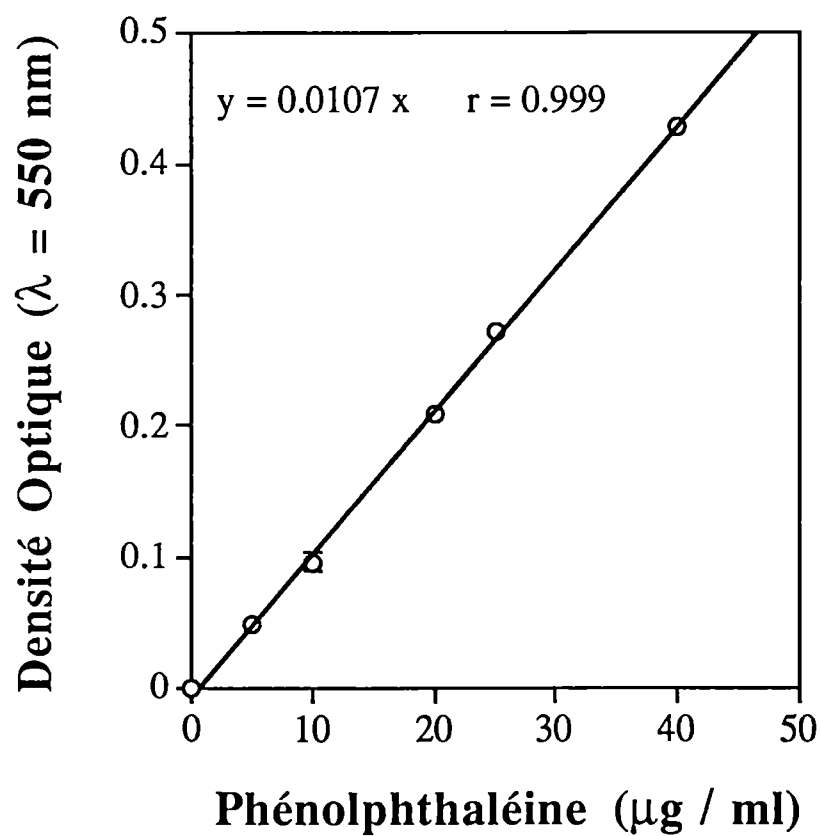


Figure 20: Courbe d'étalonnage de la densité optique en fonction de la quantité de phénolphthaléine (en  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Les valeurs (en absorbance) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 5 expériences séparées.

Tableau XX:      Activité  $\beta$ -glucuronidase totale (en unité) retrouvée dans le LBA des cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12, 24, 168 et 386 hrs après l'injection.

Temps (h)							
0	1	3	6	12	24	168	386
49.37	13.79	31.67	137.52	173.57	208.52	33.45	64.87
$\pm 10.65$	$\pm 3.31^{\dagger}$	$\pm 7.22$	$\pm 9.96^{\dagger}$	$\pm 24.03^{\dagger}$	$\pm 34.07^{\dagger}$	$\pm 6.55$	$\pm 3.04$
(5)	(4)	(4)	(8)	(6)	(6)	(8)	(4)

Les valeurs (en unité d'activité  $\beta$ -glucuronidase) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de (n) expériences séparées.  $^{\dagger}$ :  $P < 0.05$  et  $^{\ddagger}$ :  $P < 0.01$  en comparaison du groupe témoin (test t de Student pour des données non pairées).

### 4.3 Activation des mastocytes

La courbe d'étalonnage de la densité optique en fonction de la quantité d'histamine (Figure 21) a permis de montrer que les quantités totales d'histamine retrouvées dans le LBA a augmenté de 6.6, 24.8 et 19 fois, 6, 12 et 24 hrs après l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye (Tableau XXI). Cependant, 7 et 14 jours après l'injection des billes de Sephadex les quantités d'histamine retrouvées dans le LBA sont retournées près des niveaux mesurés chez les animaux témoins (Tableau XXI).

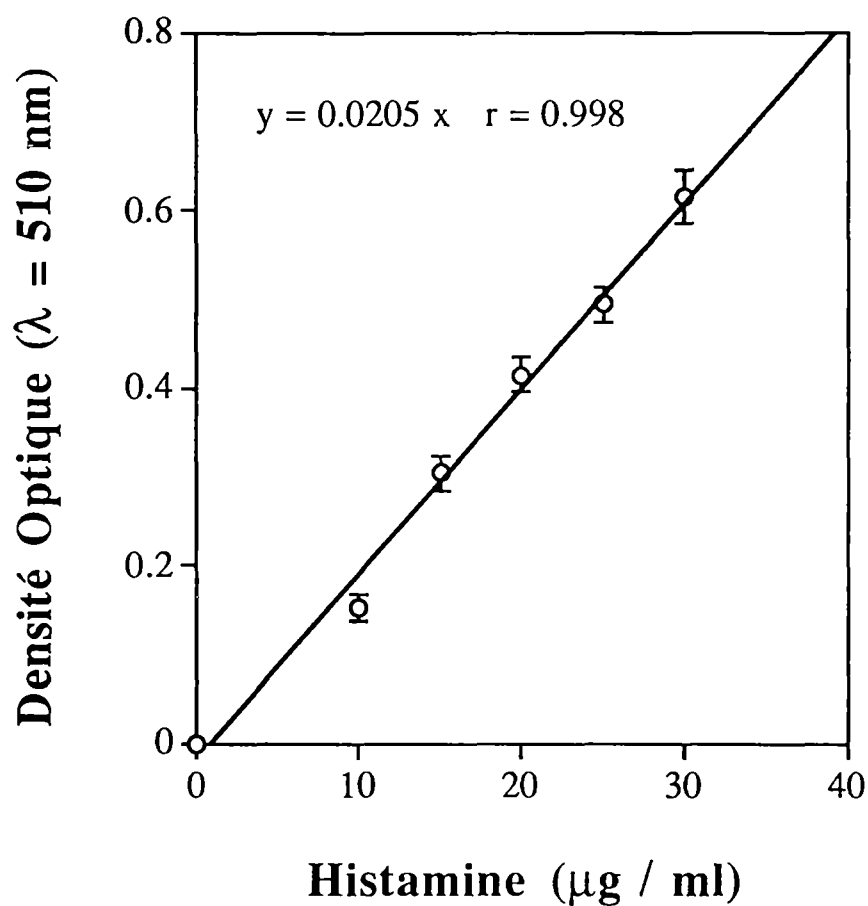


Figure 21: Courbe d'étalonnage de la densité optique en fonction de la quantité d'histamine (en  $\mu\text{g/ml}$ ). Les valeurs (en absorbance) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 6 expériences séparées.

Tableau XXI: Quantité totale d'histamine (en  $\mu\text{g}$ ) retrouvée dans le LBA des cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12, 24, 168 et 386 hrs après l'injection.

Temps (hr)							
0	1	3	6	12	24	168	386
34.05	31.82	25.17	223.18	845.87	646.44	42.76	40.18
$\pm 5.65$	$\pm 5.05$	$\pm 7.81$	$\pm 33.62^{\dagger}$	$142.46^{\dagger}$	$\pm 66.12^{\dagger}$	$\pm 7.71$	$\pm 4.53$
(5)	(4)	(4)	(8)	(6)	(6)	(8)	(4)

Les valeurs (en  $\mu\text{g}$ ) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de (n) expériences séparées.  $^{\dagger}$ :  $P < 0.01$  en comparaison du groupe témoin (test t de Student pour des données non paires).

#### **4.4 Mesure de la perméabilité microvasculaire et de l'œdème**

La courbe d'étalonnage de la densité optique en fonction de la quantité de bleu d'Evans a permis de quantifier la quantité de bleu d'Evans extraite des tissus (Figure 22). L'injection des billes de Sephadex chez le cobaye n'a pas augmenté la perméabilité microvasculaire de la trachée et de la bronche principale (excepté à 3 hrs) après l'injection des billes de Sephadex (Figures 23 A-B). Cependant, l'injection des billes de Sephadex a provoqué une augmentation de l'extravasation plasmatique du bleu d'Evans de 3.1, 4.5, 2.9, 2.2 et 2.8 fois respectivement au niveau de la bronche inférieure proximale et de 3.1, 4.5, 2.9, 2.2 et 2.8 fois respectivement au niveau de la bronche inférieure distale, 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye (Figures 24 A-B). L'extravasation plasmatique au niveau du parenchyme pulmonaire a augmenté de 2.6, 3.6, 2.9, 2.2 et 2.5 fois respectivement 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection des billes (Figure 25).

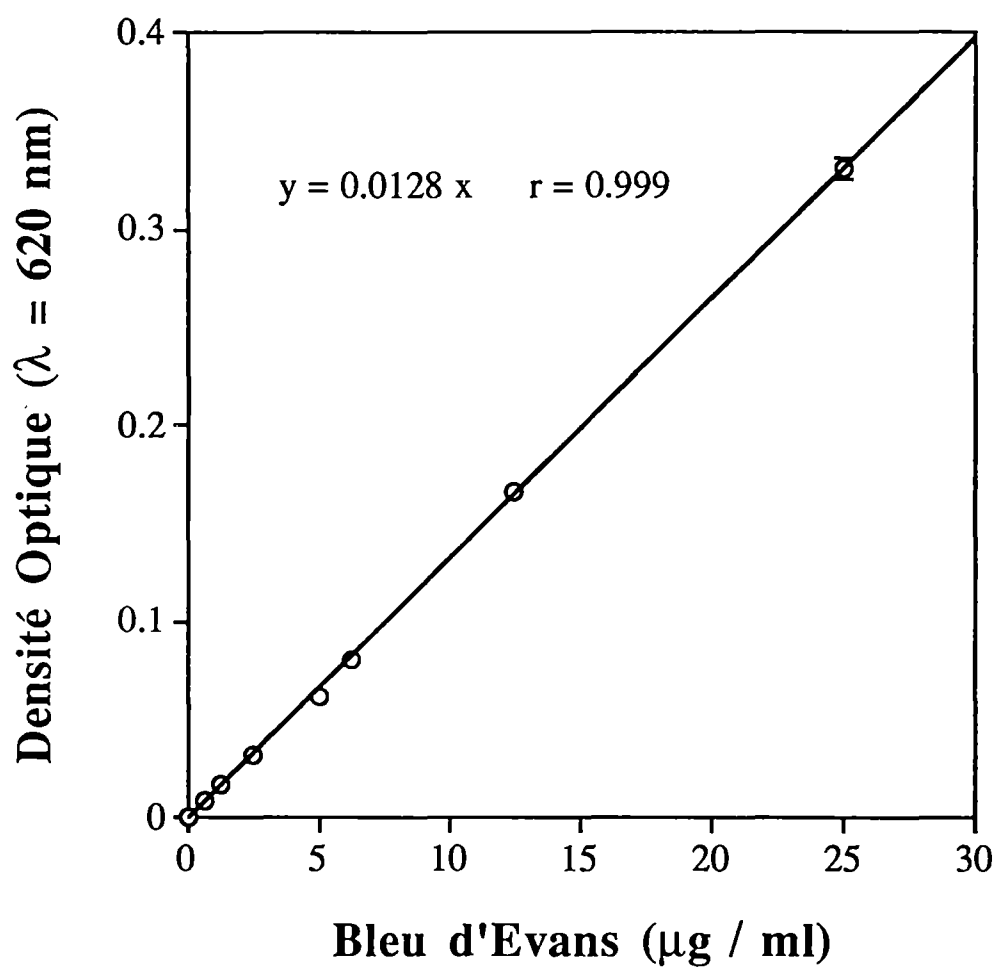


Figure 22: Courbe d'étalonnage de la densité optique en fonction de la quantité de bleu d'Evans (en  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Les valeurs (en absorbance) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 4 expériences séparées.



Figure 23: Mesure de l'extravasation de l'albumine plasmatique au niveau de la trachée (A) et de la bronche principale (B) provenant de cobayes témoins (0) et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection. Les valeurs (en ng de bleu d'Evans/mg de tissu sec) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 5 à 8 expériences séparées. \*:  $P < 0.05$  en comparaison du groupe témoin (test t de Student pour des données non pairées).

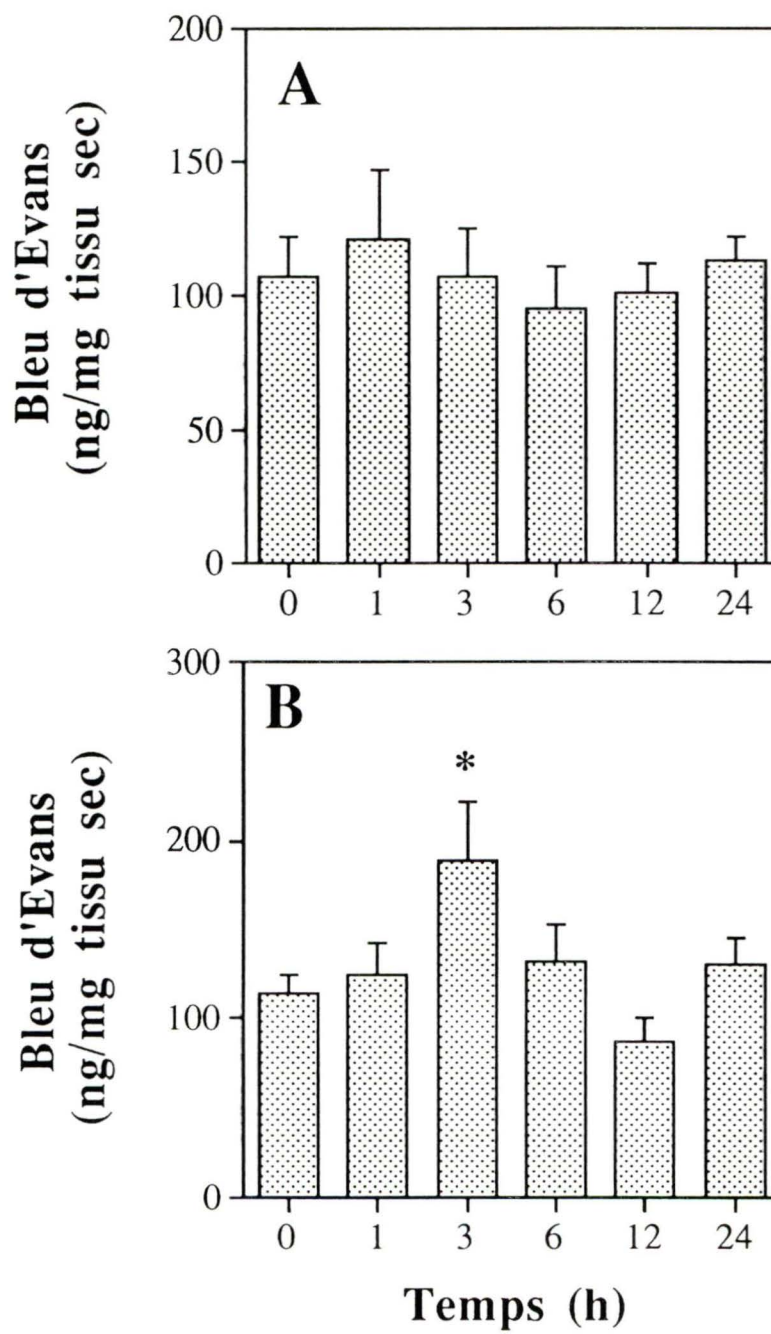
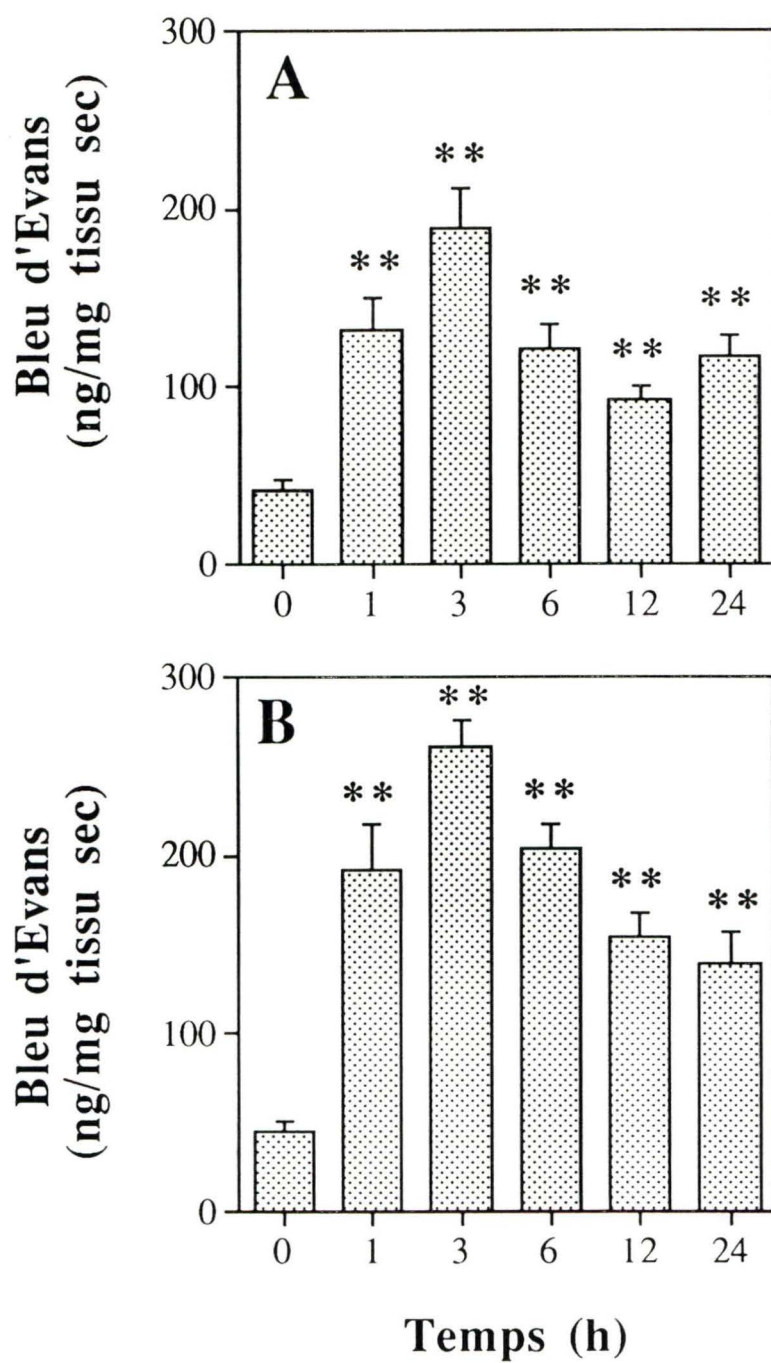


Figure 24: Mesure de l'extravasation de l'albumine plasmatique au niveau de la bronche inférieure proximale (**A**) et de la bronche inférieure distale (**B**) provenant de cobayes témoins (0) et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection. Les valeurs (en ng de bleu d'Evans/mg de tissu sec) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 5 à 8 expériences séparées. \*\*:  $P < 0.01$  en comparaison du groupe témoin (test t de Student pour des données non pairées).



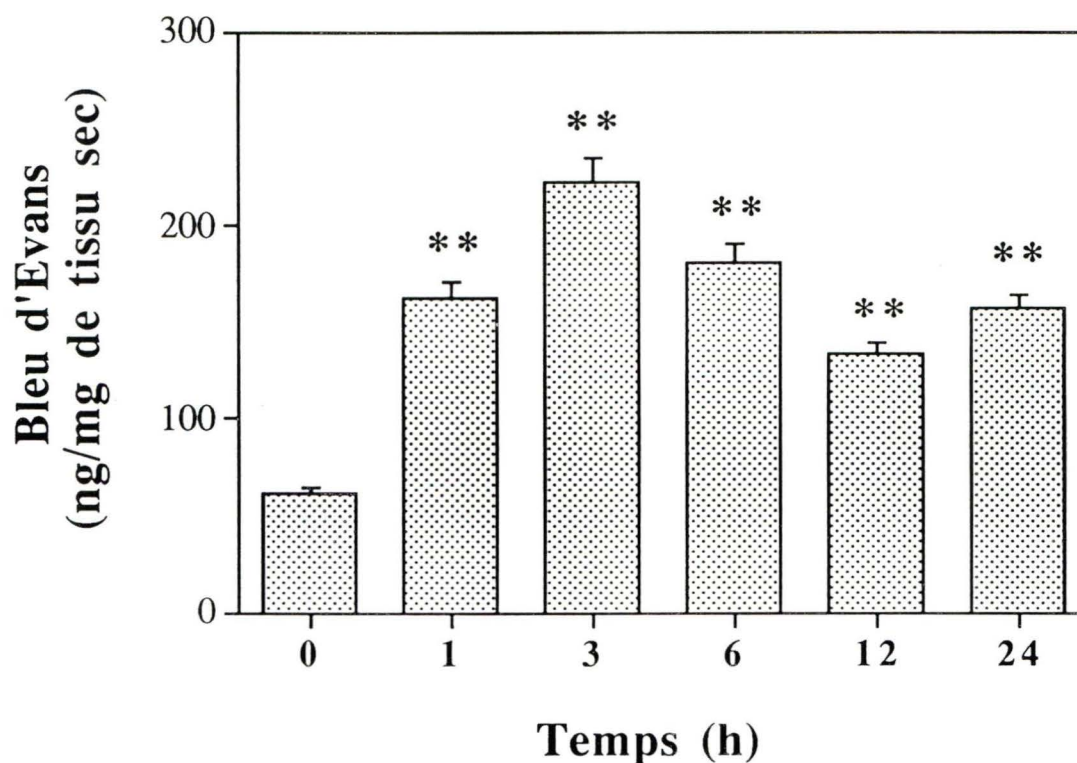


Figure 25: Mesure de l'extravasation de l'albumine plasmatique au niveau du parenchyme pulmonaire provenant de cobayes témoins (0) et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection. Les valeurs (en ng de bleu d'Evans par mg de tissu sec) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 5 à 8 expériences séparées. \*\*:  $P < 0.01$  en comparaison du groupe témoin (test t de Student pour des données non pairées).

Aucune augmentation de la perméabilité microvasculaire (sinon une diminution) n'a été obtenue au niveau du coeur, du rein, de la rate, du foie, du pancréas, du duodénum, du quadriceps droit, du diaphragme et de la peau (Figures 26 A-C). L'extravasation de l'albumine plasmatique au niveau de la trachée, de la bronche principale, du parenchyme pulmonaire, et de la bronche inférieure proximale et distale est retournée près de la valeur du groupe témoin associé, 7 et 14 jours après l'injection des billes de Sephadex (Figures 27 A-B). La détermination d'un œdème tissulaire quantifié selon l'équation 7, a indiqué aucune augmentation du poids en eau au niveau de la trachée, de la bronche principale, de la bronche inférieure proximale et distale, du coeur, du rein et de la rate, 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection (Figure 28 A-C). Les autres tissus et organes étudiés n'ont pas présenté d'œdème selon la méthode utilisée pour quantifier ce phénomène (résultats non montrés).

Figure 26: Mesure de l'extravasation de l'albumine plasmatique au niveau du coeur, du rein, de la rate (**A**), du foie, du pancréas, du duodénum (**B**), du quadriceps droit, du diaphragme et de la peau (**C**) provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection (voir l'encadré pour la légende des colonnes). Les valeurs (en ng de bleu d'Evans/mg de tissu sec) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 5 à 8 expériences séparées. \*:  $P < 0.05$  en comparaison du groupe témoin (test t de Student pour des données non pairées).

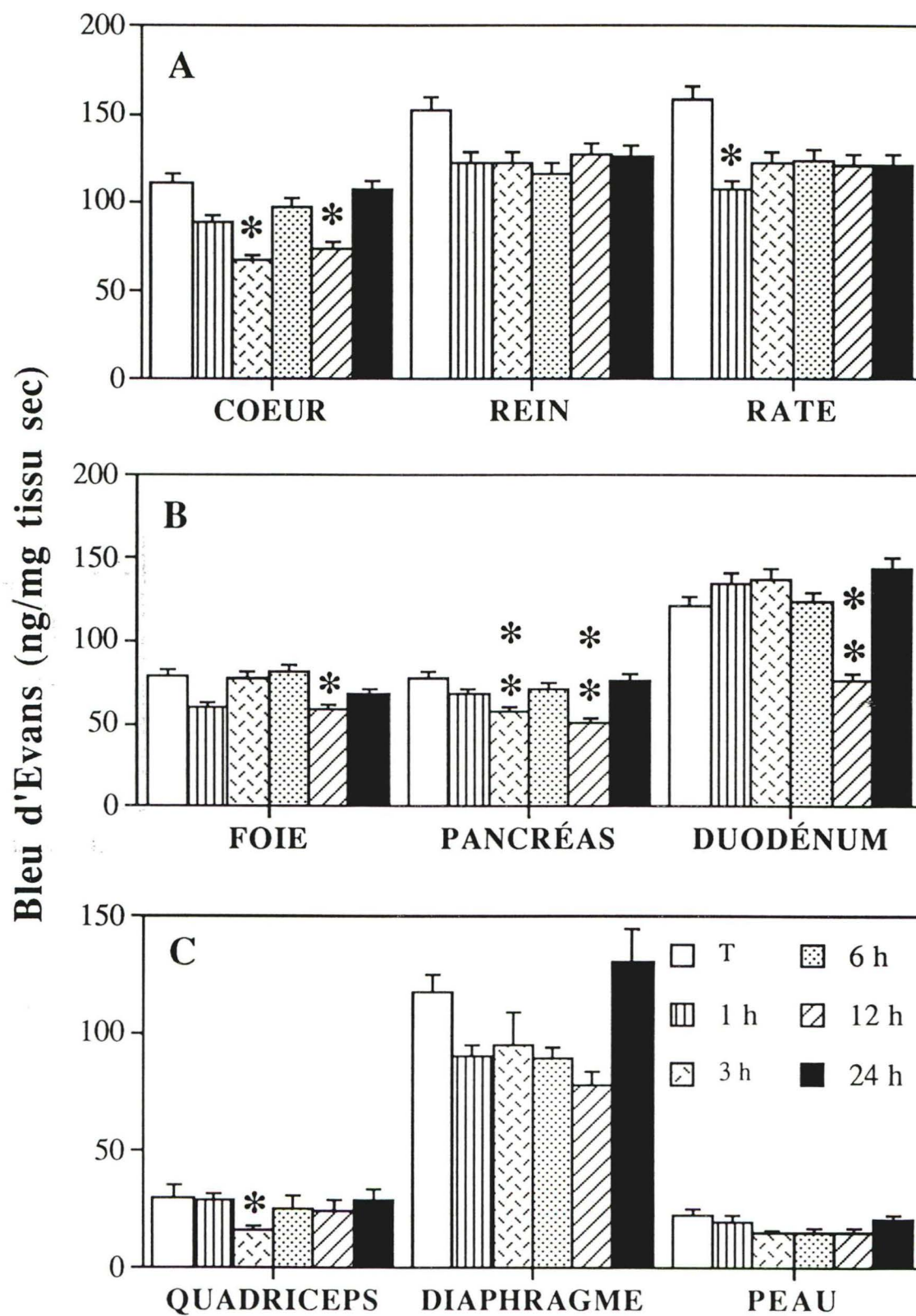




Figure 27: Mesure de l'extravasation de l'albumine plasmatique au niveau de la trachée (T), de la bronche principale (BP), du parenchyme pulmonaire (PP) (**A**) et de la bronche inférieure proximale (BIP) et distale (BID) (**B**) provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 7 et 14 jours après l'injection (voir l'encadré pour la légende des colonnes). Les valeurs (en ng de bleu d'Evans/mg de tissu sec) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 3 à 4 expériences séparées. \*:  $P < 0.05$  et \*\*:  $P < 0.01$  en comparaison du groupe témoin (test t de Student pour des données non pairées).

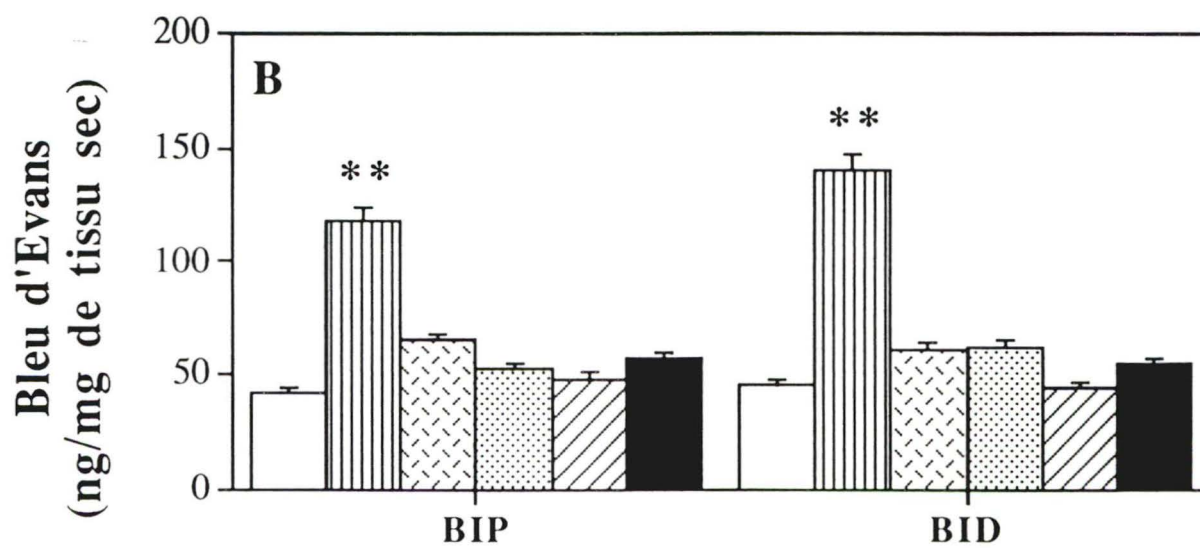
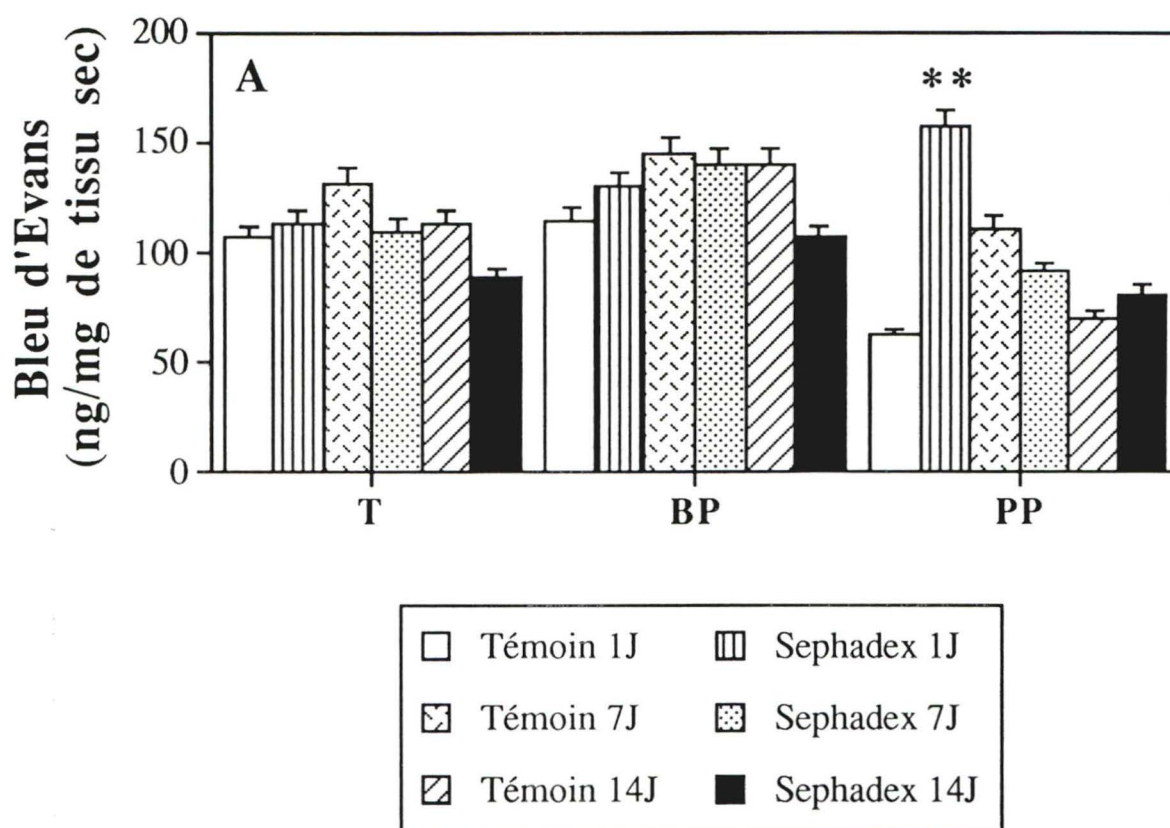


Figure 28: Mesure de la formation d'œdème au niveau de la trachée (T), de la bronche principale (BP), du parenchyme pulmonaire (PP) (**A**), de la bronche inférieure proximale (BIP) et distale (BID) (**B**), du coeur, du rein et de la rate (**C**) provenant de cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection (voir l'encadré pour la légende des colonnes). Les valeurs (correspondant au rapport: poids en H<sub>2</sub>O / poids humide du tissu) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 5 à 8 expériences séparées.



#### **4.5 Mesure de la perméabilité capillaire bronchoalvéolaire**

Les courbes d'étalonnages de la densité optique en fonction de la quantité d'albumine (Figures 29 A et B) ont permis de montrer que les quantités de protéines totales et d'albumine retrouvées dans le LBA ont augmenté respectivement de 2.6, 4.1 et 4.2 fois, et de 4.0, 6.8, 7.7 fois, 6, 12 et 24 hrs respectivement après l'injection des billes de Sephadex en comparaison du groupe témoin (Tableau XXII). Cependant, 7 et 14 jours après l'injection des billes de Sephadex les niveaux de protéines totales et d'albumine retrouvées dans le LBA sont retournés près de ceux des animaux témoins (Tableaux XXII). Les quantités d'albumine retrouvée dans le LBA a représenté environ 70 à 90 % du contenu en protéines totales 6, 12 et 24 hrs après l'injection des billes de Sephadex alors que l'albumine n'a représenté que de 30 à 50 % des protéines totales dans le LBA des autres groupes d'animaux (Tableau XXII).

Figure 29: Courbes d'étalonnages de la densité optique en fonction de la quantité d'albumine (en mg/ml) utilisées pour le dosage des protéines totales (**A**) et de l'albumine (**B**). Les valeurs (en absorbance) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de 7 à 6 expériences séparées pour les protéines totales et l'albumine respectivement.

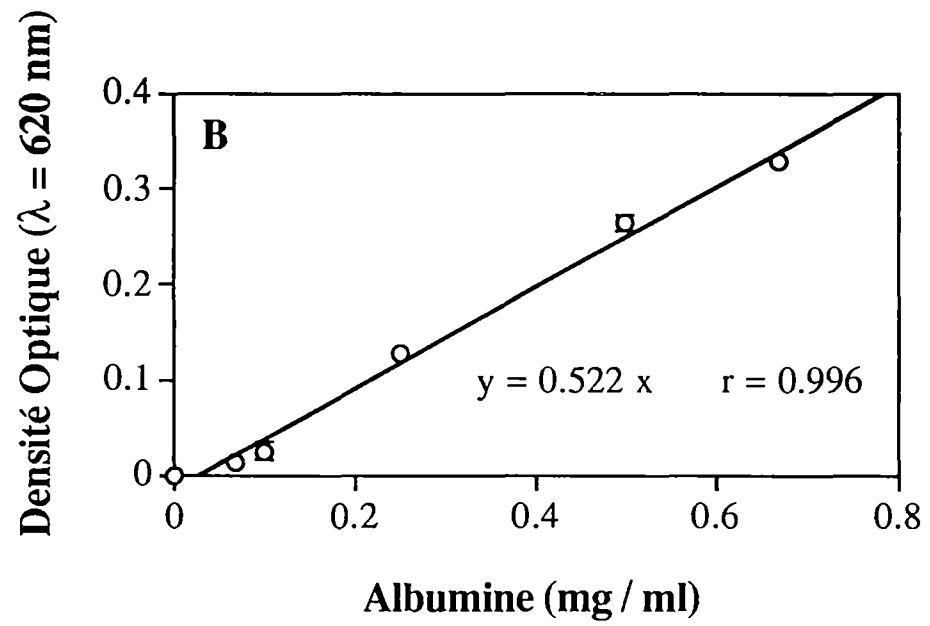
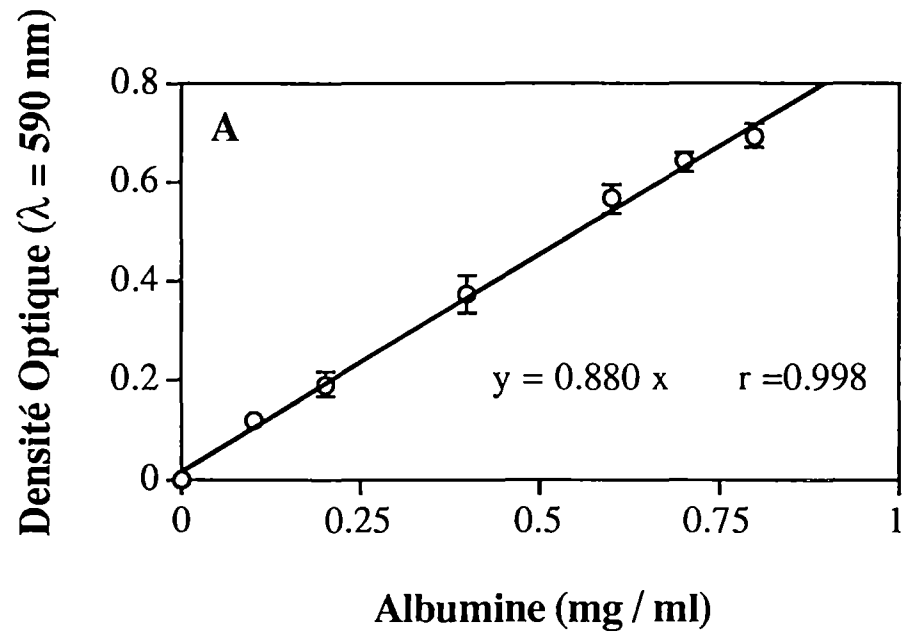


Tableau XXII: Quantité de protéines totales et d'albumine retrouvées dans le LBA des cobayes témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12, 24, 168 et 386 hrs après l'injection.

Temps (hr)	Protéine totale (mg)	Albumine (mg)
0 (n = 5)	$2.93 \pm 0.29$	$1.46 \pm 0.19$
1 (n = 4)	$2.44 \pm 0.36$	$1.17 \pm 0.28$
3 (n = 4)	$1.82 \pm 0.53$	$0.94 \pm 0.41^{\#}$
6 (n = 8)	$7.61 \pm 0.61^{\dagger}$	$5.80 \pm 0.76^{\dagger\#}$
12 (n = 6)	$11.96 \pm 0.61^{\dagger}$	$10.21 \pm 0.85^{\dagger\#}$
24 (n = 6)	$12.35 \pm 0.47^{\dagger}$	$11.30 \pm 0.50^{\dagger\#}$
168 (n = 8)	$3.00 \pm 0.34$	$1.26 \pm 0.19^{\#}$
386 (n = 4)	$3.84 \pm 0.34$	$1.09 \pm 0.08^{\#}$

Les valeurs (en mg) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de n expériences séparées.  $^{\dagger}$ :  $P < 0.01$  en comparaison du groupe témoin (test t de Student pour des données non pairées).  $^{\#}$  :  $P < 0.01$  significativement différent de la quantité de protéines totales (test t de Student pour données pairées).



#### 4.6 Activation du complément sanguin

Tel que montré à la figure 30, la transformation mathématique selon l'équation de Van Krogh des données de l'essai hémolytique a permis de définir la concentration de plasma induisant 50 % d'hémolyse via l'activation de la voie alternative du complément (AP50). La concentration du complément sanguin a diminué de 32, 51 et 74 %, 1, 3 et 6 hrs après l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye (Tableau XXIII). Lors de l'incubation *in vitro* des billes de Sephadex avec le sang total de cobaye témoin, la valeur de AP50 a diminué de 18, 42 et 58 %, 1, 3 et 6 hrs respectivement après l'incubation des billes de Sephadex en comparaison du groupe témoin respectif (Tableau XXIV).

Figure 30: Exemple de la transformation mathématique selon l'équation de Van Krogh des valeurs de l'essai hémolytique pour un plasma provenant d'un cobaye témoin (**A**) et 3 hrs après l'injection des billes de Sephadex (**B**).

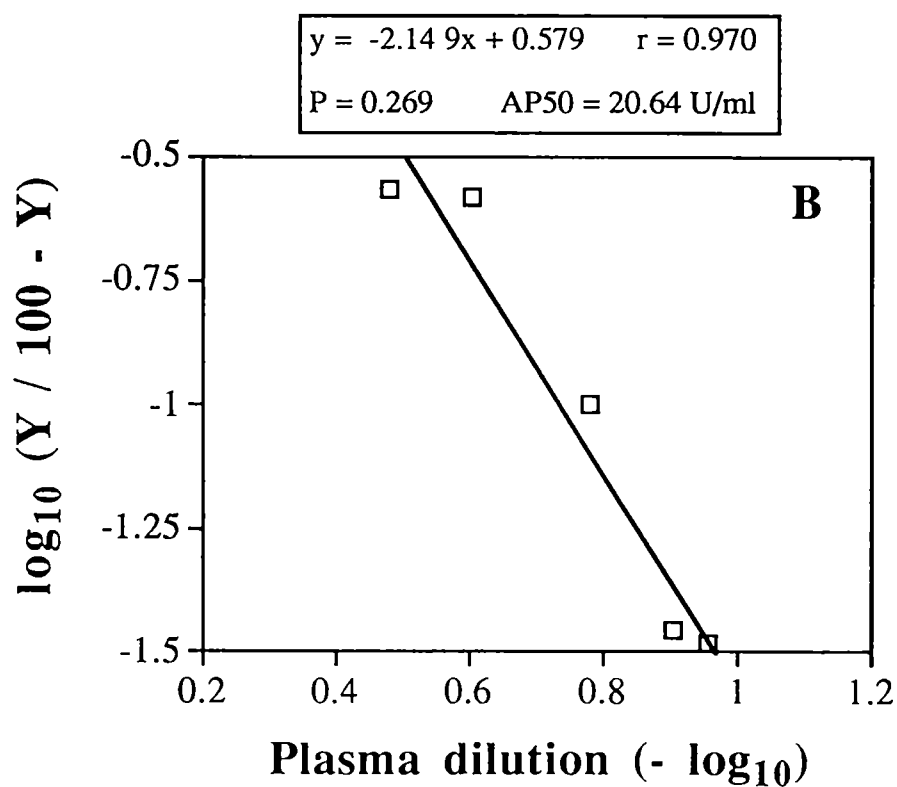
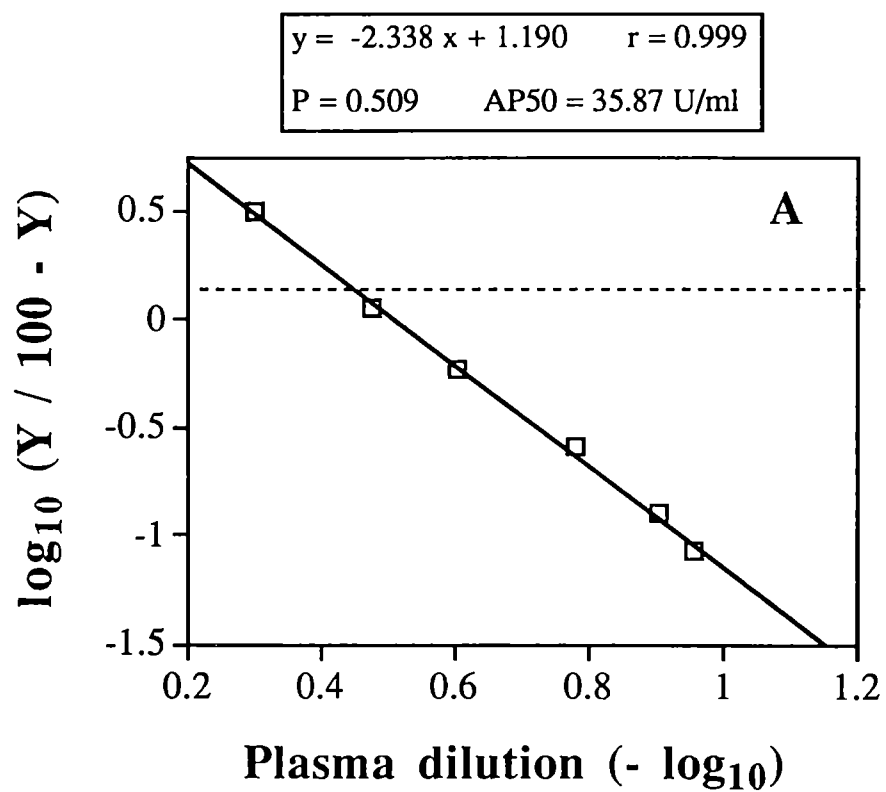


Tableau XXIII: Concentrations du complément sanguin (AP50; unité/ml) dans le plasma provenant de cobaye témoins et injectés aux billes de Sephadex 1, 3, 6, 12 et 24 hrs après l'injection des billes.

Témoin	Temps (h)				
	1	3	6	12	24
$38.49 \pm 1.67$	$26.31 \pm 2.42$	$18.83 \pm 2.73$	$9.95 \pm 0.08$	$22.18 \pm 0.41$	$28.90 \pm 3.27$
(9)	†(4)	†(6)	†(6)	†(9)	†(9)

Les valeurs (AP50 en unité/ml de sang) représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. des données obtenues de (n) expériences séparées. †:  $P < 0.05$  et ‡:  $P < 0.01$  en comparaison du groupe témoin (test t de Student pour des données non pairées).

Tableau XXIV: Activation *in vitro* du complément sanguin par les billes de Sephadex, 1, 3 et 6 hrs après l'incubation des billes de Sephadex.

		Temps (h)			
		0 <sup>a</sup>	1	3	6
AP50	T	36.15 ± 2.64	33.72 ± 2.82	32.91 ± 3.21	33.35 ± 2.50
		(4)	(4)	(4)	(3)
(unité/ml)	S	-	27.61 ± 2.63 <sup>†</sup>	19.25 ± 2.57 <sup>†</sup>	14.12 ± 2.29 <sup>†</sup>

T: témoin

S: Sephadex

<sup>a</sup>Concentrations initiales du complément sanguin

Les valeurs (en unité/ml de sang) représentent la moyenne ± S.E.M. des données obtenues de (n) expériences séparées. <sup>†</sup>: P < 0.01 en comparaison du groupe témoin (test t de Student pour données paires).

## **5 ÉTUDE DE CORRÉLATION ENTRE LES DIVERS PHÉNOMÈNES INFLAMMATOIRES ET LE DÉVELOPPEMENT DE L'HRB.**

Le développement de l'HRB chez le cobaye mesuré entre 0 et 24 h après l'injection des billes de Sephadex fut significativement corrélé au nombre d'éosinophiles sanguins et à l'activité totale EPO retrouvés dans le LBA (Tableau XXV). Cependant, le nombre d'éosinophiles retrouvés dans le LBA et le nombre apparent d'éosinophiles présents dans la bronche inférieure ne semblent pas corrélés à l'HRB. L'HRB mesurée entre 0 et 24 h fut aussi corrélée avec la quantité totale d'histamine retrouvée dans le LBA ( $r = 0.84$ ;  $P < 0.01$ ).

Le nombre d'éosinophiles retrouvés dans la bronche inférieure 1, 7 et 14 jours après l'injection des billes fut significativement corrélé aux variations de l'HRB mesurée au même temps au niveau de ce tissu ( $r = 0.988$ ,  $P < 0.01$ ). Cependant, aucune corrélation n'a été déterminée entre le maintien de l'HRB ou le développement de l'HRB au niveau du parenchyme pulmonaire (7 et 14 jours après l'injection des billes de Sephadex) et le nombre d'éosinophiles retrouvés dans le LBA.

L'activité EPO totale retrouvée dans le LBA fut corrélée au nombre d'éosinophiles ( $r = 0.801$ ;  $P < 0.05$ ) retrouvés dans le LBA, entre 0 et 24 h après l'injection des billes.

La quantité totale d'histamine retrouvée dans le LBA entre 0 et 24 h après l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye fut corrélée avec le développement de l'HRB ( $r = 0.723$ ;  $P < 0.05$ ).

Tableau XXV:      Corrélation et significativité entre la présence de l'HRB mesurée entre 0 et 24 hrs et l'infiltration et l'activation des éosinophiles.

	éosinophiles sanguins	éosinophiles du LBA	éosinophiles tissulaires	activité EPO totale
HRB	$r = 0.79$	$r = 0.65$	$r = 0.47$	$r = 0.84$
(0 à 24 h)	$P < 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P < 0.05$

Les études de corrélation sont réalisées à l'aide de la procédure "Spearman rank-order correlation" (logiciel "Primer of Biostatistics; Macintosh) qui donne la valeur de la corrélation ( $r$ ) et l'existence d'une différence significative entre les deux groupes de données.

## DISCUSSION

### 1. INDUCTION DE L'INFLUX DE CELLULES INFLAMMATOIRES DANS LES POUMONS DE COBAYE SUITE À L'INJECTION DE BILLES DE SEPHADEX

Nous avons montré que l'injection d'une dose unique de billes de Sephadex G-50 (de type Superfine) chez le cobaye conscient a induit, un jour après l'injection, une infiltration importante d'éosinophiles et de neutrophiles dans les poumons, telle que mesurée dans le LBA (Tableau IV). L'injection des billes de Sephadex G-50 a aussi induit une augmentation des populations de monocytes-macrophages et de lymphocytes. La dose de 24 mg/kg de Sephadex G-50 fut la dose maximale non-léthale pouvant être injectée chez le cobaye conscient. WALLS et BEESON (1972) furent les premiers à décrire l'induction d'une éosinophilie suite à l'injection de billes de Sephadex chez le rat. L'injection répétée de billes de Sephadex (souvent liées à un antigène) est une procédure qui produit chez le rat, après 2 ou 3 semaines, une élévation du nombre d'éosinophiles au niveau du sang et des poumons (WALLS et BEESON, 1972; SCHRIBER et ZUCKER-FRANKLIN, 1974 et 1975; EADY et coll. 1978; LEMANSKE et KALINER, 1982; LAYCOCK et coll., 1986; COOK et coll., 1989; SPICER et coll., 1990; SORDEN et coll., 1990). Contrairement au rat injecté aux billes de Sephadex (WALLS et BEESON, 1972; SCHRIBER et ZUCKER-FRANKLIN, 1974 et 1975; EADY et coll. 1978; LEMANSKE et KALINER, 1982), nous avons montré qu'une dose unique de billes (10 fois supérieure à la dose administrée chez le rat) était



nécessaire pour induire une éosinophilie chez le cobaye. De plus, nous avons aussi montré que le nombre d'éosinophiles retrouvés dans le LBA 1 jour après l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye était très supérieur au nombre obtenu chez le rat après plusieurs injections de billes (WALLS et BEESON, 1972; SCHRIBER et ZUCKER-FRANKLIN, 1974 et 1975; EADY et coll. 1978; LEMANSKE et KALINER, 1982; SPICER et coll., 1990). Ces résultats suggèrent que les mécanismes responsables de l'éosinophilie activés par l'injection des billes de Sephadex, seraient différents entre le cobaye et le rat ou qu'ils seraient activés de manière plus précoce chez le cobaye.

Une première tentative fut réalisée par Pincus (1978) afin d'induire une éosinophilie chez le cobaye suite à l'injection de billes de Sephadex. Cependant, l'auteur a relaté que l'injection de 10 mg/ml de billes de Sephadex G-200 préalablement incubées pendant 20 hrs dans la saline fut létale pour les animaux. Dans notre protocole, les billes de Sephadex G-50 ont été injectées chez l'animal immédiatement après leur mise en suspension. L'incubation des billes de Sephadex G-200 dans la saline pendant 20 hrs a sans doute provoqué un grossissement plus important des billes à l'opposé des billes injectées immédiatement après leur mise en suspension. La grosseur des billes de Sephadex G-200 ainsi obtenues après 20 hrs d'incubation a pu avoir pour conséquence de bloquer de plus gros vaisseaux et ainsi de conduire à la mort de l'animal. Les différences dans la dose de billes et le temps d'incubation choisi dans le protocole utilisé par PINCUS (1978) pourraient expliquer la mort des cobayes suite à l'injection des billes de Sephadex.

Nous avons aussi étudié l'induction de l'influx de cellules inflammatoires dans les poumons du cobaye suite à l'injection de divers types de billes de Sephadex. L'injection intraveineuse des billes de Sephadex de type G-75, G-100 et G-200 (Superfine) chez le cobaye conscient a induit une éosinophilie et une neutrophilie pulmonaire d'intensité variable (Tableau VI). Le nombre d'éosinophiles retrouvés dans le LBA a aussi augmenté suite à l'injection des billes de Sephadex G-75, G-100 et G-200 chez le cobaye. Cependant, le nombre de neutrophiles retrouvés dans le LBA était très faible chez les cobayes injectés avec les billes de Sephadex G-100 en comparaison des autres types de billes de Sephadex (Tableau VI). Les divers types de billes de Sephadex utilisés étant composés de billes de taille variable, nous avons essayé de trouver une relation entre le degré d'infiltration des deux populations de granulocytes et la taille des billes. Aucune corrélation n'a été observée entre le nombre d'éosinophiles ou de neutrophiles infiltrant les poumons et la taille des billes de Sephadex injectées.

L'administration de doses décroissantes de billes de Sephadex G-50 chez le cobaye n'a pratiquement pas modifié le degré d'infiltration des éosinophiles alors que l'influx de neutrophiles fut fortement réduit (Figure 3). Ces résultats suggèrent que l'influx de neutrophiles dans les poumons de l'animal pourrait être relié à l'intensité de l'inflammation et par conséquent à l'importance de l'embolie pulmonaire induite par les billes de Sephadex. Dans les réactions allergiques et les infections parasitaires l'accroissement marqué du nombre d'éosinophiles n'est pas lié à

l'augmentation du nombre de neutrophiles (SUN et coll., 1985; STRATH et SANDERSON, 1986; DUNN et coll., 1988). La cinétique de la migration des cellules inflammatoires dans les poumons de cobaye injecté aux billes de Sephadex a montré que l'infiltration des neutrophiles se produisait avant celle des éosinophiles (Figure 18). Nos résultats suggèrent que l'éosinophilie et la neutrophilie seraient sans doute contrôlées par des mécanismes différents.

Les mécanismes responsables de l'éosinophilie pulmonaire induite chez le cobaye par l'injection des billes de Sephadex sont sans doute très complexes. La taille et le poids en Dextran des billes de Sephadex ainsi que la nature chimique du polymère composant les billes sont des facteurs déterminant pour l'induction d'une éosinophilie chez le rat (WALLS et BEESON, 1972). L'antigénicité des Dextrans fut étudiée chez plusieurs espèces animales, incluant l'homme. Suite à l'injection intrapéritonéale de billes de Sephadex chez le cobaye, des anticorps anti-dextran ont apparu dans le sérum de l'animal environ 3 à 4 semaines après l'injection (BATTISTO et coll., 1971). Ces résultats suggèrent que l'induction de l'éosinophilie observée chez le cobaye 1 jour après l'injection des billes de Sephadex n'est probablement pas associée à une réaction du type antigène-anticorps.

L'approche utilisant l'injection de billes de Sephadex chez le cobaye dans le but d'induire une éosinophilie pulmonaire présente plusieurs avantages par rapport aux autres méthodes déjà développées chez le cobaye telles que la sensibilisation avec un extrait d'*Ascaris suum*

(IIJIMA et coll., 1987) ou avec l'ovalbumine (DUNN et coll., 1988), l'administration de PAF par aérosol (LELLOUCH-TUBIANA et coll., 1988) ou le traitement avec la polymyxin B (SUN et coll., 1985). En effet, la sensibilisation à un antigène nécessite plusieurs semaines et procure un nombre d'éosinophiles (IIJIMA et coll., 1987; DUNN et coll., 1988) bien inférieur à celui obtenu chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex (MAGHNI et coll., 1993). De plus, suivant le protocole de sensibilisation employé il semble que l'intensité de l'éosinophilie varie peu en fonction de la dose d'allergène administré à l'animal. Comme nous l'avons montré, l'éosinophilie induite chez le cobaye par l'injection des billes de Sephadex peut être contrôlée par la dose de billes administrées chez l'animal (Figure 3). Le PAF induit chez le cobaye une infiltration rapide d'éosinophiles dans les poumons (LELLOUCH-TUBIANA et coll., 1988) mais le nombre de cellules retrouvées dans le LBA est très inférieur à celui obtenu chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex (MAGHNI et coll., 1993). Le traitement avec la polymyxin B est une bonne méthode pour augmenter le nombre d'éosinophiles pulmonaires chez le cobaye puisque près de  $10^7$  éosinophiles sont retrouvés dans le LBA suite à ce traitement (SUN et coll., 1985). Cependant, l'induction de l'éosinophilie nécessite plusieurs semaines de traitement avec une administration par aérosol de la polymyxin B. En conclusion, nos travaux ont montré que l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye serait une méthode plus simple, plus rapide, reproductible et peu coûteuse pour induire une éosinophilie pulmonaire chez le cobaye conscient.

L'injection des billes de Sephadex chez le rat a induit aussi une HRB non-spécifique (LAYCOCK et coll., 1986, COOK et coll. 1990; ASSANO et coll., 1992). Le but de notre projet étant d'étudier le rôle des éosinophiles dans la pathologie de l'HRB, nous avons déterminé, par la suite, si l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye induisait une HRB chez l'animal et si cette dernière était associée à l'influx des éosinophiles dans les poumons.

## **2. ÉTUDE DE L'INFLAMMATION PULMONAIRE ET DE L'HRB 1, 7 ET 14 JOURS APRÈS L'INJECTION DU SEPHADEX**

Tel que décrit précédemment, l'injection de billes de Sephadex a induit une infiltration importante d'éosinophiles et de neutrophiles dans les poumons de cobaye 1 jour après l'injection. Les éosinophiles furent aussi retrouvés en nombre important dans le LBA 7 et 14 jours après l'injection des billes (Tableau VII). Par contre, le nombre de neutrophiles a diminué drastiquement et est devenu pratiquement nul 14 jours après l'injection (Tableau VII). Le nombre de monocytes-macrophages retrouvés dans le LBA a augmenté 7 jours après l'injection alors que le nombre de lymphocytes diminue à cette même période. L'augmentation du nombre d'éosinophiles dans le LBA 1 jour après l'injection des billes et la présence d'un nombre important d'éosinophiles au jour 7 et 14 jours suggèrent que plusieurs facteurs ont été libérés afin d'augmenter la prolifération, la maturation, la migration et la survie de ces cellules. La demie-vie des éosinophiles est courte (environ 32 hrs) et ces cellules meurent en quelques jours après leur mise en culture si aucun facteur de l'éosinopoïèse n'est

ajouté dans le milieu de culture (YOUSEFI et coll., 1994). Dans notre modèle, la présence d'un nombre important d'éosinophiles 14 jours après l'injection des billes suggère que divers facteurs sont libérés par les cellules pulmonaires pour permettre la survie des éosinophiles. L'IL-5, l'IL-3 et le GM-CSF augmentent la prolifération et la maturation des précurseurs cellulaires des éosinophiles (CLUTTERBUCK et coll., 1990; SANDERSON, 1992). L'IL-5 augmente la survie des éosinophiles *in vitro* (SANDERSON, 1992) et induit une éosinophilie pulmonaire chez le cobaye (OOSTERHOUT et coll., 1993). Récemment, DAS et coll. (1995) ont montré que l'administration d'anticorps monoclonaux anti-IL-5 chez le cobaye diminue le nombre d'éosinophiles retrouvés dans le LBA suite à l'injection des billes de Sephadex. Ces résultats suggèrent que l'IL-5 jouerait probablement un rôle important dans l'éosinophilie induite chez le cobaye suite à l'injection des billes de Sephadex. Dans notre modèle animal, le nombre d'éosinophiles sanguins a augmenté chez le cobaye 1 jour après l'injection des billes et fut demeuré élevé au jour 14. Ces résultats suggèrent aussi qu'il est possible que certains facteurs de l'éosinopoïèse soient libérés et qu'ils aient continué à favoriser l'éosinophilie sanguine et pulmonaire au cours du temps chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex.

Bien que l'éosinophilie sanguine et pulmonaire soit des événements décrits dans la pathologie de l'asthme depuis plusieurs années, le rôle joué par les éosinophiles dans la pathogénèse de l'asthme, et en particulier, dans le développement de l'HRB, reste encore incertain. Les études réalisées chez l'homme (METZGER et coll., 1986; TAYLOR ET

LUKSZA, 1987; WARDLAW et coll., 1988; DURHAM et coll., 1989; ADELROTH et coll., 1990; DJUKANOVIC et coll., 1990; WEGNER et coll., 1990; WALKER et coll., 1991; LACOSTE et coll., 1993) et dans divers modèles animaux (IIJIMA et coll., 1987; HUSTON et coll., 1988; ISHIDA et coll., 1989; SANJAR et coll., 1990; CHAPMAN et coll., 1991; WATSON et coll., 1992; HUEUER et coll., 1994) sur la relation entre l'éosinophilie et la présence de l'HRB ont conduit à des conclusions controversées sur l'interrelation de ces deux phénomènes.

Un deuxième objectif de cette recherche fut d'évaluer dans notre modèle expérimental une relation possible entre l'HRB et l'éosinophilie pulmonaire.

L'injection des billes de Sephadex chez le cobaye a augmenté la réactivité de la bronche inférieure à l'histamine et à l'acétylcholine 1 jour après (Figure 6 et 7). Ces résultats indiquent que l'HRB provoquée par l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye est non-spécifique. L'HRB de ce tissu à l'histamine et à l'acétylcholine a persisté 14 jours après l'injection. La bronche principale et le parenchyme pulmonaire n'ont pas présenté d'augmentation de leur réactivité aux divers bronchoconstricteurs, 1 jour après l'injection des billes chez l'animal (Figures 4A, 5A, 8A et 9A). Cependant, à l'opposé de la bronche principale, le parenchyme pulmonaire a présenté une HRB à l'histamine et à l'acétylcholine 7 et 14 jours après l'injection des billes (Figures 8 B-C, 9 B-C). Ces résultats indiquent que le développement de l'HRB chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex dépend du niveau de l'arbre

trachéobronchique étudié et du temps. Nous avons alors étudié dans ce modèle la possibilité que cette sélectivité du développement de l'HRB aux divers niveaux de l'arbre trachéobronchique soit dépendante de la migration, de la localisation et/ou de l'activation des éosinophiles. Nous avons ainsi montré qu'il n'existait pas de corrélation entre le nombre d'éosinophiles retrouvés dans le LBA et la réactivité bronchique des différents tissus étudiés, 1, 7 et 14 jours après l'injection des billes chez l'animal. L'absence de corrélation entre le nombre d'éosinophiles retrouvés dans le LBA et le développement de l'HRB fut aussi décrite chez le cobaye sensibilisé à l'ovalbumine (SANJAR et coll., 1990; CHAPMAN et coll., 1991; WATSON et coll., 1992; HUEUER et coll., 1994), chez le cobaye traité avec des injections intrapéritonéales de GM-CSF ou d'IL-3 (KINGS et coll., 1990), chez le cobaye sensibilisé avec un extrait d'*Ascaris suum* (YAMADA et coll., 1994) et chez le rat Brown-Norway après l'administration intratrachéale de billes de Sephadex (KUBIN et coll., 1992). Nos résultats et ceux des diverses études citées préalablement suggèrent que le nombre d'éosinophiles retrouvés dans le LBA ne serait pas toujours associé au développement de l'HRB. De ce fait, la mesure du nombre d'éosinophiles retrouvés dans le LBA ne serait pas toujours un paramètre adéquat pour évaluer la participation potentielle de ces cellules dans la pathologie de l'HRB. L'ensemble de nos résultats suggère que le nombre d'éosinophiles retrouvés dans le LBA serait plus un indice de l'existence d'un état inflammatoire dans les poumons qu'un processus pathologique déterminant dans le développement de l'HRB.



Plusieurs auteurs ont suggéré que la migration des éosinophiles dans la muqueuse et la sous-muqueuse des voies aériennes, ainsi que l'activation des éosinophiles étaient des facteurs importants à déterminer pour évaluer la participation potentielle de ces cellules dans le développement de l'HRB (FILLEEY et coll., 1982; DURHAM et KAY, 1985; LACOSTE et coll., 1993; HUEUER et coll., 1994). Dans notre étude, la mesure de l'activité EPO, comme indice du nombre apparent d'éosinophiles contenus dans les voies aériennes, a indiqué que le nombre apparent d'éosinophiles a augmenté au niveau de la bronche principale et de la bronche inférieure, 1 jour après l'injection des billes; cette augmentation fut maintenue 7 et 14 jours après l'injection des billes chez l'animal (Tableau XII). Nos résultats ne semblent pas apparemment supporter l'hypothèse que l'infiltration des éosinophiles dans les voies aériennes serait responsable du développement de l'HRB. En effet, l'activité EPO a augmenté à la fois au niveau de la bronche principale et de la bronche inférieure alors que l'HRB fut notée exclusivement au niveau de la bronche inférieure.

L'étude histologique réalisée chez le cobaye témoin et injecté aux billes de Sephadex a révélé que la bronche inférieure présentait une infiltration importante d'éosinophiles dans la muqueuse et la sous-muqueuse, 1 jour après l'injection des billes; l'étude histologique a aussi confirmé que l'augmentation du nombre d'éosinophiles dans la bronche inférieure persistait 7 et 14 jours après l'injection. Bien que l'augmentation du nombre d'éosinophiles dans la bronche principale 1 jour après l'injection des billes fut confirmée par l'étude histologique, cette

dernière a aussi révélé que ces cellules n'étaient pas localisées dans la muqueuse ou la sous-muqueuse de ce tissu mais près des structures cartilagineuses. L'étude histologique a donc permis de confirmer l'augmentation du nombre d'éosinophiles dans la bronche principale et la bronche inférieure suite à l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye. Cette étude a surtout permis de montrer la localisation sélective des éosinophiles dans ces tissus. Nos résultats montrent aussi que la détermination du nombre apparent d'éosinophiles tissulaires par la mesure de l'activité EPO est certainement une bonne méthode pour déterminer l'intensité de l'éosinophilie mais elle ne permet pas de localiser l'infiltration des éosinophiles dans le tissu. De ce fait, la détermination du nombre apparent d'éosinophiles infiltrant un tissu par la mesure de l'activité EPO est une donnée qu'il faut interpréter avec prudence. Comme nous le discuterons plus en avant, la détermination de la cinétique de l'éosinophilie au niveau de la bronche inférieure (étudiée en relation avec le développement de l'HRB) fut réalisée par la mesure de l'activité EPO dans ce tissu. Nous savons maintenant qu'il faut interpréter les données obtenues en tenant compte du fait que cette méthode de mesure du nombre apparent d'éosinophiles ne donne aucune information sur la localisation de ces cellules dans le tissu étudié.

La spécificité de la localisation des éosinophiles infiltrant la bronche principale et la bronche inférieure et le développement sélectif de l'HRB suggèrent que la localisation et le degré d'infiltration des éosinophiles pourraient être des facteurs importants dans le développement de l'HRB dans ce modèle. La possibilité de l'existence d'une relation entre le degré

d'infiltration des éosinophiles dans les voies aériennes et le développement de l'HRB pourraient être supportées par l'étude histologique du parenchyme pulmonaire. Cette étude a montré que les éosinophiles présents autour des bronchioles 1 jour après l'injection des billes ont infiltré la sous-muqueuse et la muqueuse de ces tissus au jour 7 et que cette infiltration d'éosinophiles dans les voies aériennes coïncidait avec l'apparition de l'HRB au niveau du parenchyme pulmonaire. Cependant, la migration des éosinophiles dans la muqueuse et la sous-muqueuse des bronchioles et l'apparition subséquente de l'HRB au niveau de ce tissu n'impliquent pas pour autant une relation de cause à effet.

L'ensemble de nos résultats suggère que la localisation et le degré d'infiltration des éosinophiles dans la muqueuse et la sous-muqueuse des voies aériennes, et non le nombre d'éosinophiles retrouvés dans le LBA, pourraient être impliqués dans le développement et/ou le maintien de l'HRB chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex. De plus, la persistance de l'éosinophilie sanguine et pulmonaire chez l'animal suggère qu'il existerait toujours une migration des éosinophiles dans les voies aériennes et dans la lumière bronchique 14 jours après l'injection des billes de Sephadex chez l'animal. Dans ce cas, il serait intéressant de déterminer si la persistance de l'éosinophilie sanguine et pulmonaire participerait au maintien de l'HRB dans notre modèle. Afin de confirmer ces hypothèses, il faudrait envisager de bloquer sélectivement l'éosinophilie sanguine et/ou pulmonaire par divers agents pharmacologiques. Il serait ainsi possible de déterminer l'incidence de

l'éosinophilie sanguine et du degré de migration des éosinophiles dans les voies aériennes sur le développement de l'HRB dans notre modèle animal.

Bien que la localisation et le degré de migration des éosinophiles dans les voies aériennes pourraient jouer un rôle important dans le développement de l'HRB, la dégranulation des éosinophiles et la libération subséquente de leurs protéines cationiques pourraient être aussi un facteur important à considérer dans la pathologie de l'HRB (FRIGAS et coll., 1980; FLAVAHAN et coll., 1988; MOTOJIMA, 1989; UCHIDA et coll., 1993). Certains travaux ont indiqué que les quantités de MBP retrouvées dans le LBA des sujets asthmatiques semblaient associer à la sévérité de l'HRB (WARDLAW et coll., 1988; GRIFFIN et coll., 1991; LACOSTE et coll., 1993). La MBP a augmenté la réactivité et la contraction maximale de la trachée de cobaye (BROFMAN et coll., 1989). Dans notre modèle, l'activité EPO retrouvée dans le LBA a augmenté 1 jour après l'injection des billes de Sephadex mais elle est retournée près de la valeur du groupe témoin 7 et 14 jours après l'injection (Tableau XIII). La dégranulation des éosinophiles, observée 1 jour après l'injection des billes de Sephadex, pourrait être impliquée dans le développement de l'HRB mesurée 1 jour après l'injection. Cependant, afin de vérifier cette hypothèse il serait nécessaire de bloquer l'activation des éosinophiles ou l'action des protéines cationiques (la MBP en particulier) et de déterminer l'incidence de cette inhibition sur le développement de l'HRB. Même s'il est possible d'envisager un rôle pour les protéines cationiques dans le développement de l'HRB 1 jour après l'injection des billes chez le cobaye, leur participation dans le maintien de l'HRB serait peu probable. En effet, nos

résultats indiquent que les éosinophiles présents dans le LBA 7 et 14 jours après l'injection des billes n'ont pas sécrété leurs protéines cationiques. Cependant, il serait possible d'envisager que le développement de l'HRB induite par les protéines cationiques dérivées des éosinophiles soit un phénomène de longue durée qui ne nécessiterait pas une dégranulation *de novo* des éosinophiles pour maintenir l'état d'hyperréactivité. Cette hypothèse est peu envisageable puisque les travaux de COYLE et coll. (1993) et UCHIDA et coll. (1993) ont montré que le développement de l'HRB induite chez le rat par l'instillation intratrachéale de la MBP est un phénomène de courte durée. Nos résultats montrent que chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex, les éosinophiles sont activés et ont libéré leurs protéines cationiques dans la lumière des voies aériennes. Cependant, l'importance de cette dégranulation des éosinophiles dans le développement et/ou le maintien de l'HRB chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex reste encore à déterminer.

Certains auteurs ont suggéré que la migration et la dégranulation des éosinophiles dans les voies aériennes seraient responsables de la desquamation de l'épithélium bronchique observée chez certains sujets asthmatiques et que cette desquamation de l'épithélium serait responsable du développement de l'HRB (DUNNILL, 1960; JEFFERY et coll., 1989). Dans notre modèle, malgré l'infiltration des éosinophiles dans les voies aériennes, la dégranulation des éosinophiles dans la lumière bronchique et le développement de l'HRB, il n'existe aucune évidence histologique d'une desquamation de l'épithélium bronchique. Ces résultats suggèrent que la migration des éosinophiles dans les voies aériennes et la

dégranulation de ces cellules dans la lumière bronchique n'altèreraient pas forcément l'intégrité structurale de l'épithélium bronchique. Il est intéressant de noter que dans les biopsies bronchiques provenant de sujets asthmatiques (LOZEWICK et coll., 1990) et dans les études histologiques réalisées dans divers modèles animaux d'asthme expérimental (DUNN et coll., 1988; ISHIDA et coll., 1989; GUNDEL et coll., 1990), l'épithélium bronchique semblait intact alors que l'éosinophilie pulmonaire et l'HRB étaient présentes. La possibilité que les éosinophiles activés secrètent leurs protéines cationiques sans affecter la morphologie de l'épithélium bronchique pourrait être expliquée par les travaux de FLAVAHAN et coll., (1988). Ces auteurs ont montré que des concentrations non cytotoxiques de MBP ont augmenté la contraction du muscle lisse bronchique. De plus, la MBP et les polypeptides cationiques synthétiques ont aussi augmenté la bronchoconstriction à l'acétylcholine chez le cobaye (DESSAI et coll., 1993) et chez le rat (UCHIDA et coll., 1993) sans affecter la morphologie de l'épithélium bronchique. L'ensemble de ces données et les résultats de notre étude suggèrent que la migration des éosinophiles dans les voies aériennes et la dégranulation de ces cellules dans la lumière bronchique n'induit pas toujours une desquamation de l'épithélium bronchique. Il serait intéressant de déterminer si ces évènements inflammatoires pourraient altérer les fonctions physiologiques de l'épithélium bronchique et si de telles altérations pourraient conduire au développement de l'HRB.

En conclusion de la deuxième partie de cette étude, nos résultats suggèrent que la localisation et le degré de migration des éosinophiles, ainsi que leur activation pourraient être impliqués dans le développement

de l'HRB chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex. L'inhibition de la migration et/ou de la dégranulation des éosinophiles permettraient de mieux comprendre le rôle joué par ces événements inflammatoires dans l'induction de l'HRB dans notre modèle animal. Le développement d'une stratégie adéquate pour inhiber la prolifération, la migration et/ou la dégranulation des éosinophiles nécessite la connaissance des cinétiques de l'éosinophilie sanguine et pulmonaire. Dans la suite de ce projet, nous avons donc étudié la cinétique de l'éosinophilie sanguine et pulmonaire chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex. De plus, nous avons étudié la cinétique de l'HRB et nous l'avons comparé à la cinétique de l'éosinophilie sanguine et pulmonaire. Nous avons déterminé la cinétique de l'HRB au niveau de la bronche inférieure puisque ce tissu a présenté une HRB 24 hrs après l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye.

### **3 CINÉTIQUE DE L'INFLAMMATION PULMONAIRE ET DE L'HRB CHEZ LE COBAYE INJECTÉ AUX BILLES DE SEPHADEX**

L'étude de la cinétique de l'apparition de l'éosinophilie et de l'HRB suite à l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye a révélé 1) que l'éosinophilie sanguine a débuté 3 hrs après l'injection des billes, 2) que le recrutement des neutrophiles a débuté à 3 hrs alors que l'infiltration des éosinophiles et l'activation de ces cellules ont débuté 6 hrs après l'injection des billes et 3) que la réactivité de la bronche inférieure à l'histamine a augmenté 3 hrs après l'injection des billes et fut maximale 12 hrs après l'injection.

La cinétique d'apparition de l'éosinophilie dans le sang s'est traduite par deux augmentations successives du nombre d'éosinophiles sanguins 3 et 12 hrs après l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye (Figure 17B). La possibilité que les deux augmentations successives des éosinophiles sanguins soient induites par des mécanismes différents reste à déterminer dans ce modèle animal.

L'analyse du contenu cellulaire du LBA a indiqué que les populations d'éosinophiles et de lymphocytes ont augmenté à partir de 6 hrs et furent maximales 24 hrs après l'injection des billes de Sephadex (Figure 18 B et D). Par contre, la population de neutrophiles a augmenté 3 hrs après l'injection des billes (Figure 18 C). Après une diminution initiale du nombre de macrophages 1 hr après l'injection des billes, la population de monocytes-macrophages a augmenté 12 hrs après l'injection. Nos résultats indiquent que la cinétique de l'éosinophilie et de la neutrophilie sont différentes ce qui suggèrent, une fois encore, que les mécanismes responsables de l'éosinophilie et de la neutrophilie sont probablement pas identiques.

La cinétique de l'éosinophilie au niveau de la bronche inférieure a indiqué une augmentation du nombre apparent d'éosinophiles à 6 hrs suivie d'une diminution transitoire à 12 hrs et d'une nouvelle augmentation 24 hrs après l'injection des billes (Figure 18). L'augmentation initiale du nombre apparent d'éosinophiles au niveau de la bronche inférieure 6 hrs après l'injection des billes est en accord avec l'augmentation initiale du nombre d'éosinophiles retrouvés dans le LBA



au même temps. La diminution du nombre apparent d'éosinophiles contenus dans la bronche inférieure 12 hrs après l'injection des billes de Sephadex pourrait s'expliquer par la migration progressive de ces cellules dans la lumière bronchique. L'augmentation du nombre apparent d'éosinophiles contenus dans la bronche inférieure 24 hrs après l'injection des billes de Sephadex pourrait provenir d'une diminution des mécanismes cellulaires responsables de la migration de ces cellules dans la lumière bronchique.

L'activité EPO retrouvée dans le LBA a augmenté à 6 hrs, fut maximale à 12 hrs et fut maintenue 24hrs après l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye (Tableau XIX). L'activité EPO retrouvée dans le LBA au cours du temps fut corrélée au nombre d'éosinophiles retrouvés dans le LBA. Ces résultats suggèrent que les éosinophiles retrouvés dans le LBA ont été activés et ont libéré leurs protéines cationiques.

La cinétique de l'HRB au niveau de la bronche inférieure a montré que la réactivité de ce tissu à l'histamine a augmenté à 3 hrs, fut maximale à 12 hrs et fut maintenue 24 hrs après l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye (Figure 16).

Les études de corrélations suggèrent que chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex le développement de l'HRB serait associé à l'augmentation du nombre d'éosinophiles sanguins et à l'activité EPO retrouvée dans le LBA au cours du temps. Chez le sujet asthmatique, le nombre d'éosinophiles sanguins fut corrélé à la sévérité de l'HRB (HORN

et coll., 1975; METZGER et coll., 1986; TAYLOR ET LUKSZA, 1987; WARDLAW et coll., 1988; BRUSASCO et coll., 1990). Chez le rat injecté aux billes de Sephadex, l'augmentation de la réactivité du parenchyme pulmonaire à la sérotonine fut corrélée à l'intensité de l'éosinophilie sanguine (LAYCOCK et coll., 1986; SPICER et coll., 1989). Comme nous l'avons mentionné préalablement, différents auteurs ont suggéré que l'augmentation de la quantité des protéines cationiques dérivés des éosinophiles contenues dans le LBA pourrait être associée au degré de l'HRB chez les sujets asthmatiques (GLEICH, 1990; GUNDEL et coll., 1991; GRIFFIN et coll., 1991; LACOSTE et coll., 1993). Nos résultats suggèrent que dans notre modèle animal, l'éosinophilie sanguine et l'activation des éosinophiles retrouvés dans le LBA pourraient être des événements reliés au développement de l'HRB. Cependant, il serait nécessaire d'inhiber ces événements inflammatoires afin de vérifier cette hypothèse. Il n'existe aucune corrélation entre le nombre d'éosinophiles retrouvés dans la bronche inférieure et dans le LBA, et le développement de l'HRB dans notre modèle animal. Comme nous l'avons aussi mentionné préalablement, plusieurs études ont décrit l'absence de corrélation entre le nombre d'éosinophiles contenus dans le LBA et le développement de l'HRB (BRUSASCO et coll., 1990; SANJAR et coll., 1990; HUEUER ET COLL., 1994). Dans le cas de la détermination du nombre apparent d'éosinophiles contenus dans la bronche inférieure comme indice du degré de l'éosinophilie au niveau de ce tissu, il serait nécessaire de déterminer le nombre exact d'éosinophiles présents dans ce tissu et l'état d'activation de ces cellules. Une étude histologique plus approfondie (morphométrie) nous permettrait de mieux caractériser l'éosinophilie

bronchique. Ces informations pourraient alors nous permettre de montrer l'importance ou non du degré de migration et d'activation des éosinophiles dans le développement de l'HRB au niveau de la bronche inférieure.

L'ensemble des résultats de cette troisième partie de l'étude suggère que l'éosinophilie sanguine et l'activation des éosinophiles retrouvés dans le LBA pourraient être des événements inflammatoires associés au développement de l'HRB. Par contre, le degré de migration des éosinophiles dans la bronche inférieure et le nombre d'éosinophiles retrouvés dans le LBA ne sembleraient pas reliés au développement de l'état d'hyperréactivité.

Nous nous sommes intéressés, par la suite, à étudier quels seraient les autres événements inflammatoires présents chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex et leur relation potentielle avec le développement de l'HRB dans ce modèle animal.

#### **4 ÉTUDE DES AUTRES ÉVÈNEMENTS INFLAMMATOIRES PRÉSENTS DANS CE MODÈLE ANIMAL**

Nous avons montré préalablement que le degré de migration des neutrophiles dans les poumons dépendait de la dose de billes de Sephadex injectée à l'animal (Figure 3). L'injection de deux doses différentes de billes, qui a induit chez l'animal une neutrophilie moyenne et faible en comparaison de la dose initiale de 24 mg/kg (Figure 3), n'a pas modifié l'HRB mesurée au niveau de la bronche inférieure 24 hrs après l'injection

des billes (Figure 19). Nos résultats suggèrent que les neutrophiles ne sembleraient pas impliquer dans l'HRB mesurée 24 hrs après l'injection des billes chez l'animal. Diverses études ont montré que l'infiltration des neutrophiles dans les poumons ne semblait pas lier au développement de l'HRB chez le sujet asthmatique (WARDLAW et coll., 1988; LACOSTE et coll., 1993) et dans divers modèles animaux d'asthme expérimental (THOMPSON et coll., 1986; HUTSON et coll., 1990; GUNDEL et coll., 1992a). Le rôle joué par les neutrophiles dans le développement de l'HRB reste encore à définir dans notre modèle animal. Il serait ainsi intéressant d'étudier si les neutrophiles retrouvés dans le LBA 3 hrs après l'injection des billes participeraient au déclenchement de l'HRB chez l'animal.

Nous étions aussi intéressés à étudier la cinétique de l'activation des cellules inflammatoires suite à l'injection des billes de Sephadex. Nous avons alors mesuré l'activité  $\beta$ -glucuronidase retrouvée dans le LBA comme indice d'une activation des cellules inflammatoires. L'augmentation de l'activité  $\beta$ -glucuronidase retrouvée dans le LBA 6 hrs après l'injection des billes de Sephadex chez l'animal indique que les cellules inflammatoires du LBA sont activées dans ce modèle (Tableau XX). La possibilité d'une association entre l'activation des cellules inflammatoires (mesure de l'activité  $\beta$ -glucuronidase) et l'apparition de l'HRB chez le cobaye sensibilisé et exposé à l'ovalbumine a été suggérée par WALLS et coll., 1991. Dans notre modèle animal, bien que le développement de l'HRB semble être corrélé à l'augmentation de l'activité  $\beta$ -glucuronidase retrouvée dans le LBA, il resterait à déterminer quelles

populations de cellules inflammatoires seraient activées et quel serait le rôle de cette activation sur le développement de l'HRB. Il est intéressant de noter que l'activité  $\beta$ -glucuronidase retrouvée dans le LBA est retournée près du niveau des animaux témoins, 7 et 14 jours après l'injection des billes de Sephadex chez l'animal (Tableau XX). Ces résultats suggèrent que les cellules inflammatoires ne seraient plus activées 7 et 14 jours après l'injection des billes de Sephadex. Ces résultats sont en accord avec l'absence d'activation des éosinophiles (mesurée par l'activité EPO retrouvée dans le LBA) notée 7 et 14 jours après l'injection des billes. Nos résultats suggèrent que le déclenchement de l'HRB mesurée au niveau de la bronche inférieure pourrait être relié à l'activation des cellules inflammatoires. Par contre, le maintien de l'HRB au niveau de la bronche inférieure et le développement de l'HRB au niveau du parenchyme pulmonaire ne seraient pas dépendants d'une activation *de novo* des cellules inflammatoires. Cependant, il resterait à déterminer si l'absence d'une activité  $\beta$ -glucuronidase dans le LBA serait un indice suffisant pour conclure de l'absence de toute forme d'activation chez ces cellules.

Nous nous sommes aussi intéressés à étudier la possibilité d'une activation des mastocytes dans notre modèle animal par la mesure de la quantité d'histamine retrouvée dans le LBA. Nos résultats ont montré que la quantité d'histamine retrouvée dans le LBA a augmenté à 6 hrs, fut maximale à 12 hrs et maintenue 24 hrs après l'injection des billes chez l'animal ce qui suggère que dans notre modèle les mastocytes sont probablement activés (Tableau XXI). Le rôle joué par l'histamine dans la pathologie de l'HRB chez le sujet asthmatique reste encore incertain

(WENZEL et coll., 1988; TANAKA et coll., 1991). Dans notre modèle, bien que le développement de l'HRB semble être corrélé à la quantité d'histamine retrouvée dans le LBA, il faudrait montrer quel serait l'incidence d'une inhibition de l'action de l'histamine libérée sur le développement de l'HRB. Il est intéressant de noter que la quantité d'histamine retrouvée dans le LBA est retournée près du niveau des animaux témoins, 7 et 14 jours après l'injection des billes de Sephadex chez l'animal (Tableau XXI). Ces résultats suggèrent que les mastocytes pulmonaires ne seraient plus activés 7 et 14 jours après l'injection des billes de Sephadex. Nos résultats suggèrent que le déclenchement de l'HRB mesurée au niveau de la bronche inférieure pourrait être relié à l'activation des mastocytes. Par contre, le maintien de l'HRB au niveau de la bronche inférieure et le développement de l'HRB au niveau du parenchyme pulmonaire ne seraient pas dépendants d'une activation *de novo* des mastocytes. Il serait intéressant de déterminer si l'inhibition de l'activation des mastocytes ou de l'action de l'histamine libérée serait suffisante pour inhiber le développement et/ou le maintien de l'HRB dans notre modèle animal.

Nous avons aussi étudié les variations dans la perméabilité microvasculaire à différents niveaux de l'arbre trachéobronchique suite à l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye. L'injection des billes de Sephadex chez le cobaye a induit une augmentation de l'extravasation plasmatique 1 hr après l'injection des billes au niveau de la bronche inférieure et du parenchyme pulmonaire (Figures 24 et 25). L'augmentation de la perméabilité microvasculaire au niveau de ces

tissus fut maximale à 3 hrs et maintenue 24 hrs après l'injection des billes chez l'animal. Cependant, aucune augmentation de la perméabilité microvasculaire (à l'exception de la bronche principale 3 hrs après l'injection des billes) n'a été notée dans les divers tissus et organes prélevés chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex aux différents temps de l'étude (Figures 23 et 26). Ces résultats suggèrent que l'injection intraveineuse des billes de Sephadex chez le cobaye induit de manière sélective une augmentation de l'extravasation plasmatique au niveau pulmonaire. Cependant, nos résultats suggèrent qu'il n'existerait pas d'œdème au niveau des divers tissus et organes isolés chez le cobaye après l'injection des billes. La méthode que nous avons utilisée pour mesurer l'œdème dans les tissus, n'est peut être pas adéquate pour déterminer d'une manière précise ce phénomène. En effet, cette méthode est basée sur la mesure du poids en eau du tissu isolé et l'œdème est évalué par l'augmentation du poids en eau de ce tissu en comparaison du groupe témoin. De ce fait, il est possible que l'accumulation d'eau présente au niveau des tissus ne soit pas assez importante pour être quantifiée par simple pesée de ces tissus. De plus, la technique d'isolation des tissus, en particulier des voies aériennes, ne nous permet pas d'éviter l'évaporation d'une certaine quantité d'eau contenue initialement dans les tissus. La détermination de la formation d'œdème par la simple mesure du poids en eau du tissu n'est probablement pas une technique très précise pour évaluer cet événement inflammatoire.

L'existence d'une augmentation de l'extravasation plasmatique et de la formation d'œdème dans la pathologie asthmatique est suggérée par

l'étude des biopsies bronchiques qui montre la présence d'une exudation des protéines plasmatiques de la microcirculation bronchique et la formation d'œdème tissulaire (DUNNILL et coll., 1969; BROGAN et coll., 1975; LAM et coll., 1985). L'extravasation plasmatique et l'œdème subséquent provoquent un accroissement de l'épaisseur de la paroi bronchique qui augmente la résistance des voies aériennes chez le sujet asthmatique (JAMES et coll., 1989). Dans notre modèle, le développement de l'HRB ne semblerait pas être associé à l'augmentation de la perméabilité microvasculaire notée dans la bronche inférieure. En effet, la perméabilité microvasculaire a augmenté au niveau de la bronche inférieure 1 hr après l'injection des billes de Sephadex alors qu'aucune augmentation de la réactivité de ce tissu n'a été notée. Cependant, il est possible d'envisager que l'augmentation de la perméabilité microvasculaire au niveau de la bronche inférieure suite à l'injection des billes ne serait pas un événement suffisant à lui seul pour induire l'HRB. Il est possible aussi d'envisager que l'augmentation de la perméabilité microvasculaire dans la bronche inférieure n'induit pas aussitôt un changement dans la réactivité bronchique de ce tissu. De ce fait, un certain délai pourrait être nécessaire pour activer les mécanismes qui seraient responsables d'un changement dans la réactivité bronchique suite à l'augmentation de l'extravasation plasmatique. De plus, le degré d'augmentation de la perméabilité microvasculaire pourrait aussi être un facteur important pour induire un changement dans la réactivité bronchique. Ces deux hypothèses pourraient être, en partie, supportées par nos résultats qui ont montré une augmentation de la réactivité de la bronche inférieure 3 hrs après l'injection des billes chez l'animal; ce



temps correspond aussi à l'augmentation maximale de l'extravasation plasmatique au niveau de ce tissu. De ce fait, nos résultats sembleraient indiquer que le développement de l'HRB pourrait dépendre du degré de l'état inflammatoire présent au niveau des voies aériennes. Il serait donc nécessaire d'inhiber l'augmentation de l'extravasation plasmatique et d'étudier l'incidence de cette inhibition sur le développement de l'HRB dans notre modèle animal. Il est possible aussi d'envisager qu'un changement dans la perméabilité microvasculaire des voies aériennes n'aurait pas d'incidence sur la réactivité de ces tissus mesurée *ex vivo* qui constitue une situation dans laquelle les tissus (isolés et taillés) ne sont plus sous leur forme originale. En effet, dans la plupart des études portant sur l'incidence de l'œdème pulmonaire dans le développement de l'HRB, la réactivité bronchique (ou la résistance des voies aériennes) a été mesurée *in vivo* chez l'humain (PUERINGER et HUNNINGHAKE, 1992) et dans divers modèles animaux (KIMURA et coll., 1992) ou *in situ* chez l'animal (MISEROCCHI et coll., 1993). Dans notre étude, les modifications morphologiques apportées à la bronche inférieure après son isolation du reste du poumon ne permettraient peut être pas de mesurer *ex vivo* l'incidence d'une augmentation de la perméabilité microvasculaire sur la réactivité bronchique de ce tissu. Dans le cas où l'augmentation de la perméabilité microvasculaire serait un événement impliqué dans le développement de l'HRB, nos résultats suggèrent que le maintien de l'HRB au niveau de la bronche inférieure et le développement de l'HRB au niveau du parenchyme pulmonaire ne seraient pas dépendants de la persistance d'une augmentation de l'extravasation plasmatique pulmonaire au cours du temps.

Bien que la formation d'œdème n'ait pu être quantifiée dans notre modèle avec l'approche méthodologique que nous avons utilisée, certains auteurs ont suggéré que la présence des protéines plasmatiques (en particulier l'albumine sérique) dans la lumière bronchique pourrait être une indication de l'existence d'un œdème pulmonaire (BROGAN et coll., 1975; LAM et coll., 1985). Dans notre modèle, nous avons montré que la quantité d'albumine plasmatique contenue dans le LBA a augmenté à 6 hrs et fut maximale 12 et 24 hrs après l'injection des billes de Sephadex chez l'animal (Tableau XXII). Nos résultats suggèrent que l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye a induit une augmentation de la perméabilité capillaire bronchoalvéolaire. Bien que l'augmentation de la quantité d'albumine sérique soit corrélée à l'HRB, la participation de l'augmentation de la perméabilité capillaire bronchoalvéolaire dans le développement de l'état d'hyperréactivité reste encore à déterminer dans notre modèle. Il serait nécessaire, dans ce cas aussi, d'inhiber cet évènement inflammatoire et d'étudier l'incidence de cette inhibition sur le développement de l'HRB. Dans le cas où l'augmentation de la perméabilité capillaire bronchoalvéolaire serait un évènement impliqué dans le développement de l'HRB, nos résultats suggèrent que le maintien de l'HRB au niveau de la bronche inférieure et le développement de l'HRB au niveau du parenchyme pulmonaire ne seraient pas dépendants de la persistance de cet évènement inflammatoire au cours du temps.

L'activation du complément sanguin par la voie directe ou alternative conduit à la formation de divers fragments dont certains ( $C_{5a}$ ,  $C_{3b}$  ...) sont des médiateurs pro-inflammatoires. Certains auteurs ont

montré que le Dextran était une substance capable d'activer le complément sanguin *in vitro* (VIDEM et MOLLNES, 1994). Nous avons finalement étudié la possibilité d'une activation du complément sanguin chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex. Nous avons montré que la concentration du complément sanguin a diminué à 1 hr et fut minimale 6 hrs après l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye (Tableau XXIII). Cependant, la concentration du complément sanguin a augmenté à nouveau à 12 hrs et est retournée proche de la concentration notée chez le groupe témoin, 24 hrs après l'injection des billes chez l'animal (Tableau XXIII). Cette activation du complément sanguin a été aussi notée *in vitro* lors de l'incubation des billes de Sephadex avec le sang total de cobaye (Tableau XXIV). Nos résultats suggèrent que l'injection intraveineuse des billes de Sephadex chez le cobaye a activé le complément sanguin et que cette activation serait peut être attribuable à une interaction directe du Dextran (composant la bille) avec le complément sanguin. Le rôle potentiel de l'activation du complément sanguin dans le développement de l'HRB et dans l'apparition des autres événements inflammatoires décrits dans ce modèle sont actuellement à l'étude.

## CONCLUSION

Les résultats présentés dans cet ouvrage indiquent:

- 1- que l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye a induit une neutrophilie et une éosinophilie pulmonaire qui furent dépendantes de la dose de billes administrées.
- 2- que l'injection des billes de Sephadex chez le cobaye a induit une HRB non-spécifique.
- 3- que l'éosinophilie sanguine et pulmonaire ont persisté 7 et 14 jours après l'injection des billes de Sephadex chez l'animal.
- 4- que le développement de l'HRB pourrait être associé au degré de migration des éosinophiles dans la muqueuse et la sous-muqueuse des voies aériennes et à l'activation des éosinophiles retrouvés dans la lumière bronchique.
- 5- que le développement de l'HRB ne semblerait pas être associé au nombre d'éosinophiles contenus dans la bronche inférieure et dans le LBA chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex.
- 6- que le maintien de l'HRB pourrait être en relation avec la persistance de l'éosinophilie sanguine et pulmonaire.

7- que le développement et le maintien de l'HRB furent notés en l'absence d'une desquamation de l'épithélium bronchique.

8- que les neutrophiles ont infiltré les poumons de cobaye suite à l'injection des billes mais que le rôle joué par les neutrophiles dans le développement de l'HRB resterait à être déterminer dans notre modèle animal.

9- que dans notre modèle animal les processus inflammatoires tels que: l'activation des cellules inflammatoires, l'activation des mastocytes, l'augmentation de la perméabilité microvasculaire et de la perméabilité capillaire bronchoalvéolaire ont été activées 1 jour après l'injection des billes et sont "désactivées" 7 et 14 jours après.

10- que dans notre modèle animal, ces évènements inflammatoires pourraient participer dans le développement de l'HRB mais peut-être pas dans le maintien de l'état d'hyperréactivité.

11- que le complément sanguin fut activé chez le cobaye injecté au billes de Sephadex et que cette activation pourrait provenir d'une interaction directe entre le complément et le Dextran composant les billes.

En conclusion, l'ensemble de nos résultats suggère que le déclenchement de l'HRB chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex pourrait être associé à l'activation de divers évènements inflammatoires et pourrait dépendre du degré d'inflammation présent dans les voies

aériennes. Nos résultats suggèrent aussi que la persistance de l'éosinophilie sanguine et pulmonaire au cours du temps pourrait être responsable du maintien de l'HRB chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex. Cependant, il est possible d'envisager que les autres événements inflammatoires présents 24 hrs après l'injection des billes chez l'animal pourraient induire des changements morphologiques, cellulaires et/ou biochimiques au niveau des voies aériennes qui seraient aussi responsables du maintien de l'HRB, même après la "désactivation" de ces événements. Il serait intéressant de déterminer quels seraient *in vivo* les mécanismes "anti-inflammatoires" responsables de la désactivation des événements inflammatoires notés dans notre modèle animal. La connaissance de ces mécanismes de "désactivation" nous permettrait peut-être de mieux comprendre les mécanismes de la chronicité de la réaction inflammatoire observée dans les voies aériennes des sujets asthmatiques. Il serait intéressant de définir si l'activation du complément sanguin serait le "maître d'œuvre" de toute cette cascade d'événements inflammatoires notés dans notre modèle. Il serait aussi intéressant de déterminer la durée de l'HRB chez le cobaye injecté aux billes de Sephadex et dans le cas d'un maintien de l'état d'hyperréactivité au-delà de deux semaines, de déterminer si l'éosinophilie sanguine et pulmonaire seraient toujours présente à cette période. Enfin, il serait intéressant d'étudier la possibilité que le degré d'inflammation (intensité et/ou prédominance de certains événements inflammatoires) au niveau des voies aériennes serait un facteur plus déterminant dans le développement et/ou le maintien de l'HRB que la simple présence d'un état inflammatoire. Dans le cas où cette hypothèse serait vérifiée, une telle

étude permettrait de connaître la limite à atteindre dans le degré de l'inflammation pulmonaire (intensité et/ou prédominance de certains évènements inflammatoires) pour créer un débalancement dans l'homéostasie des voies aériennes qui induirait l'HRB.

En considération de toutes les connaissances acquises dans ce modèle animal, il serait nécessaire dans des études futures de déterminer la meilleure stratégie pour inhiber de manière sélective chacun de ces évènements inflammatoires (en particulier l'éosinophilie) et d'étudier l'incidence de ces inhibitions sur le développement et le maintien de l'HRB. Ces études nous permettraient de définir quels évènements inflammatoires prédomineraient sur les autres pour induire et maintenir l'état d'hyperréactivité et nous conduiraient peut être à une nouvelle conception ou classification des évènements inflammatoires potentiellement impliqués dans la pathologie de l'HRB.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Dr Pierre Sirois, le directeur de mes recherches et directeur du département de pharmacologie de la faculté de médecine de l'Université de Sherbrooke, pour m'avoir accepté dans ses laboratoires et pour m'avoir donné tous les moyens nécessaires à la réalisation du présent projet de recherche. Il a su aussi me sensibiliser aux différentes facettes de la recherche. Je suis certain que cet enseignement me sera très utile dans ma future carrière de chercheur. Qu'il soit assuré de toute ma reconnaissance.

Je tiens à remercier le Dr Alain Cadieux, professeur au département de pharmacologie de la faculté de médecine de l'Université de Sherbrooke, pour la réalisation des travaux de l'étude histologique et pour ses nombreux conseils judicieux. Qu'il soit assuré de toute ma reconnaissance.

Je tiens à remercier spécialement Madame Solange Cloutier pour toute l'aide technique qu'elle m'a apporté tout au long du déroulement de ce projet mais surtout pour ses conseils judicieux qui ont aidé à la bonne réalisation de ce projet, ainsi que pour son amitié. Qu'elle soit assurée de toute ma reconnaissance.

Mes remerciements s'adressent aussi à mes collègues et amis, Madame Chantal Lanoue et Messieurs Daniel Arseneault, Jean-François Blain, François Blanchette, Sébastien Martineau, Stéphane Pelletier et



Martin Simard pour leur aide dans la réalisation de ce projet, pour leur amitié et les bons moments passés ensemble. Qu'ils soient assurés de toute ma reconnaissance.

Je tiens aussi à remercier tous mes autres amis du département de pharmacologie, et en particulier, Messieurs Fernand Gobeil Jr et Richard Bouley pour leur amitié et les bons moments passés ensemble.

J'adresse mes remerciements aux examinateurs de cet ouvrage: le Dr Raymond Bégin, M.D. (Pneumologie, Sherbrooke), le Dr Yves Berthiaume, M.D., le Dr Alain Cadieux, Ph.D. et le Dr Pierre Sirois, Ph.D.

Je tiens à remercier le Conseil de recherches médicales du Canada pour m'avoir octroyé une bourse d'études afin de réaliser mes travaux de recherches au doctorat.

Je tiens enfin à remercier mes parents, mes soeurs, mon frère ainsi que tous les membres de ma famille pour leur profonde affection et pour leur soutien tout au long de ces années.

Ce projet de recherche a été rendu possible grâce aux octrois du Conseil de recherches médicales du Canada et du Fonds de recherche en santé du Québec obtenu par le Dr Pierre Sirois.

## BIBLIOGRAPHIE

- ADELROTH, E., ROSENHALL, L., JOHANSSON, S-A., LINDEN, M., VENGE, P. (1990) Inflammatory cells and eosinophilic activity in asthmatics investigated by bronchoalveolar lavage. The effects of antiasthmatic treatment with budesonide or terbutaline. *Am. Rev. Respir. Dis.* **142**: 91-99.
- ALFARO, C., SHARMA, O.P., NAVARRO, L. et GLOVSKY, M.M. (1989) Inverse correlation of expiratory lung flows and sputum eosinophils in status asthmaticus. *Annals Allergy* **63**: 251-254.
- ALIAKBARI, J., SREEDHARAN, S.P., TURCK, C.W. et GOETZL, E.J. (1987) Selective localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in human eosinophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148**: 1440-1445.
- ASANO, M., INAMURA, K., NAKAHARA K., NAGAYOSHI, A., IONO, T., HAMADA, K., OKU, T., NOTSU, Y., KOHSAKA, M. ET ONO, T. (1992) A 5-lipoxygenase inhibitor, FR110302, suppresses airway hyperresponsiveness and lung eosinophilia induced by Sephadex particles in rats. *Agents Actions* **36**: 215-221.
- AYERS, G.H., ALTMAN, L.C., GLEICH, G.J., LOEGERING, D.A. et BAKER, C.B. (1985) Eosinophil and eosinophil granule mediated pneumocyte injury. *J Allergy Clin Immunol* **76**: 595-604.

BARKER, R.L., GUNDEL, R.H., GLEICH, G.J., CHECKEL, J.L., LOEGERING, D.A., PEASE, L.R. et HAMANN, K.J. (1991) Acidic polyamino acids inhibit human eosinophil major basic protein toxicity. *J. Clin. Invest.* **88**: 798-805.

BARNES, P.J. (1986a) Neural control of human airways in health and disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* **134**: 1289-1314.

BARNES, P.J. (1986b) Asthma as an axon reflex. *Lancet* **1**: 242-248.

BARNES, P.J. (1987) Neuropeptides in human airways: function and clinical implications. *Am. Rev. Respir. Dis.* **136**: S77-S83.

BARNES, P.J. (1989) New concepts in the pathogenesis of bronchial hyperresponsiveness and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **83**: 1013-1026.

BARNES, P.J., CHUNG, K.F., PAGE, C.P. (1988) Inflammatory mediators and asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **140**: 49-84.

BARNES, P.J., IND, P., DOLLERY, C.T. (1981) Inhaled prazosin in asthma. *Thorax* **36**: 378-381.

BATTISTO, J.R., D. BUDMAN ET R. FREEDMAN. (1971) Specificity of fixation loci for homocytotropic antibodies. *J. Exp. Med.* **134**: 381-394.

- BEASLEY, R., ROCHE, W.R., ROBERTS, J.A. et HOLGATE, S.T. (1989)  
Cellular events in the bronchi in mild asthmatics. *Am. Rev. Respir. Dis.* **139**: 806-817.
- BENTLEY, A.M., MAESTRELLI, P., SAETTA, M., FABBRI, L.M.,  
ROBINSON, D.S., BRADLEY, B.L., JEFFERY, P.K., DURHAM, S.R.,  
KAY, A.B. (1992a) Activated T-lymphocytes and eosinophils in the  
bronchial mucosa in isocyanate-induced asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **89**: 821-829.
- BENTLEY, A.M., MENZ, G., STORZ, C., ROBINSON, D.S, BRADLEY, B.,  
JEFFERY, P.K., DURHAM, S.R., KAY, A.B. (1992b) Identification of  
T lymphocytes, macrophages and activated eosinophils in the  
bronchial mucosa in intrinsic asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **146**: 500-  
506.
- BOICHOT, E., LAGENTE, V., CARRE, C., WALTHMAN, P., MENCIA-  
HUERTA, J.M. et BRAQUET, P. (1991) Bronchial  
hyperresponsiveness and cellular infiltration in the lung of guinea  
pigs sensitized and challenged by aerosol. *Clin. Exp. Allergy* **21**: 67-76.
- BORGEAT, P., FRUTEAU DE LACLOS, B., RABINOVITCH, H.,  
PICARD, S., BRAQUET, P., HÉBERT, J. et LAVIOLETTE, M. (1984)  
Eosinophil-rich human polymorphonuclear leukocyte preparations

characteristically release leukotriene C<sub>4</sub> on ionophore A23187 challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.* 74: 310-315.

BOUCHER, R.C. (1994) Human airway ion transport. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **150**: 581-593.

BOULET, L-P., LATIMER, K.M., ROBERTS, R.S. et al. (1984) The effect of atropine on allergen-induced increases in bronchial responsiveness to histamine. *Am. Rev. Respir. Dis.* **130**: 368-372.

BOUSHEY, H.A., HOLTZMAN, M.J., SELLER, J.R. et NADEL, J.A. (1980) Bronchial hyperreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.* **121**: 384-413.

BRADDING, P., ROBERTS, J.A., BRITTEN, K.M., MONTEFORT, S., DJUKANOVIC, R., MUELLER, R., HEUSSER, C.H., HOWARTH, P.H., et HOLGATE, S.T. (1994) Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in normal and asthmatic airways: Evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **10**: 471-480.

BRADLEY, B.L., AZZAWI, M., JACOBSON, M., ASSOULI, B., COLLINS, J.V., IRANI, A.M., SCHWARTZ, L.B., DURHAM, S.R., JEFFREY, P.K. et KAY, A.B. (1991) Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: comparison with biopsy specimens from

atopic subjects and relation to bronchial hyperresponsiveness. *J. Allergy Clin. Immunol.* **88**: 661-674.

BROFMAN, J.D., WHITE, S.R., BLAKE, J.S., MUNOZ, N.M., GLEICH, G.J. et LEFF A.R. (1989) Epithelial augmentation of trachealis contraction caused by major basic protein of eosinophils. *J. Appl. Physiol.* **66**: 1867-1867.

BROIDE, D.H., PAINE, M.M. et FIRESTEIN, G.S. (1992) Eosinophils express interleukin 5 and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor mRNA at the sites of allergic inflammation in asthmatics. *J. Clin. Invest.* **90**: 1414-1424.

BRUSASCO, V., CRIMI, P., GIANIORIO, P., LANTERO, S. et ROSSI, G.A. (1990) Allergen-induced increase in airway responsiveness and inflammation in mild asthma. *J. Appl. Physiol.* **69**: 2209-2214.

BURKA, J.F. (1986) The interaction of histamine with other bronchoconstrictor mediators. *Can. J. Physiol.* **65**: 442-447.

BURROWS, B., MARTINEZ, F.D., HALONEN, M., BARBEE, R.A. et CLINE, M.G. (1989) Asociation of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N. Engl. J. Med.* **320**: 271-277.

- CALHOUN, W.J., BATES, M.E., SCHRADER, L., SEDWICK, J.B. et BUSSE, W.W. (1992) Characteristics of peripheral blood eosinophils in patients with nocturnal asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **145**: 577-581.
- CARLOS, T.M. et HARLAN, J.M. (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* **84**: 2068-2101.
- CASTERLINE, C.L., EVANS, R. et WARD, G.W. (1976) The effect of atropine and albuterol aerosols on human bronchial response to histamine. *J. Allergy Clin. Immunol.* **58**: 608-612.
- CASTRO, F.F., SCHMITZ-SCHUMAN, M., ROTHER, M. et KIRSCHFINK, M. (1991) Complement activation by house dust: reduced reactivity of serum complement in patients with bronchial asthma. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **96**: 305-310.
- CHAND, N., NOLAN, K., DIAMANTIS, W. et SOFIA, R.D. (1992) Repeated aerochallenge induces lung dysfunction but not bronchial hyperresponsiveness in conscious guinea pigs. *Agents Actions* **37**: 181-183.
- CHANEZ, P., BOUSQUET, J., COURET, I., CORNILLAC, L., BARNEON, G., VIC, P., MICHEL, F.B. et GODARD, P. (1991) Increased numbers of hypodenses alveolar macrophages in patients with bronchial asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **144**: 923-930.

- CHAPMAN, I.D., BOUBEKEUR, K et MORLEY, J. (1991) Airway eosinophilia and airway hyperreactivity are parallel rather than sequential events in the guinea-pigs. *Agents Actions* **34**: 445-456.
- CHUNG, K.F., ROGERS, D.F., BARNES, P.J. et EVANS, T.W. (1990) The role of airway microvascular permeability and plasma exudation in asthma . *Eur. Respir. J.* **3**: 329-337.
- CLUTTERBUCK, E.J. et SANDERSON, C.J. (1990) The regulation of human eosinophil precursor production by cytokines: A comparison of rh IL1, rh IL3, rh IL4, rh IL6 and GM-CSF. *Blood* **75**: 1774-1779.
- COOK, R.M., MUSGROVE N.R.J. ET SMITH H. (1989) Eosinophils and the granulomatous reaction in rats injected with Sephadex particles. *Pulmonary Pharmacology* **2**: 185-190.
- COYLE, A.J., ACKERMAN, S.J., et IRVIN, C.G. (1993) Cationic proteins induce airway hyperresponsiveness dependent on charge interactions. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**: 896-900.
- CRIMI, E., CHIARAMONDIA, M., MILANESE, M., ROSSI, G.A. et BRUSASCO, V. (1991) Increased numbers of mast cells in bronchial mucosa after the late-phase asthmatic response to allergen. *Am. Rev. Respir. Dis.* **144**: 1282-1286.



- DAS, A.M., WILLIAMS, T.J., LOBB, R. et NOURSHARGH, S. (1995) Lung eosinophilia is dependent on IL-5 and the adhesion molecules CD18 and VLA-4, in a guinea-pig model. *Immunology* **84**: 41-46.
- DE JONGSTE, J.C., MONS, H., BONTA, I.L. et KERREBIJN, K.F. (1987) *In vitro* responses of airways from an asthmatic patient. *Eur. J. Respir. Dis.* **71**: 23-29.
- DE MONCHY, J.G.R., KAUFFMAN, H.F., VENGE, P., KOETER, G.H., JANSEN, H.M., SLUITER, H.J. et DE VRIES, K. (1985) Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am. Rev. Respir. Dis.* **131**: 373-376.
- DESSAI, S.N., VAN, G., ROBSON, J., LETTS, L.G., GUNDEL, R.H., GLEICH, G.J., PIPER, P.J. et NOONAN, T.C. (1993) Human eosinophil major basic protein augments bronchoconstriction induced by intravenous agonists in guinea pigs. *Agents Actions* **39**: C132-C135.
- DJUKANOVIC, R., ROCHE, W.R., WILSON J.W., BEASLEY, C.R.W., TWENTYMAN, O.P., HOWARTH, P.H. et HOLGATE, S.T. (1990) Mucosal inflammation in asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **142**: 434-457.
- DJUKANOVIC, R., WILSON, J.W., BRITTEN, K.M., WILSON,, S.J., WALLS, A.F., HOWARTH, P.H. et HOLGATE, S.T. (1990) Quantification of mast cells and eosinophils in the bronchial mucosa

of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunohistochemistry. *Am. Rev. Respir. Dis.* **142**: 863-871.

DOUMAS, B.T., WATSON, W.A., BIGGS, H.G. (1971) Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin. Chim. Acta* **31**: 87-96.

DULFANO, M.J. et LUCK, C.K. (1982) Sputum and ciliary inhibition in asthma. *Thorax* **37**: 646-651.

DUNN, C.J., G.A. ELLIOTT , J.A. OOSTVEEN et I.M. RICHARDS. (1988) Development of a prolonged eosinophil-rich inflammatory leukocyte infiltration in the guinea-pig asthmatic response to ovalbumin inhalation. *Am. Rev. Resp. Dis.* **137**: 541-547.

DUNNILL, M.S. (1960) The pathology of asthma with special reference to changes in the bronchial mucosa. *J. Clin. Pathol.* **13**: 27- 33.

DUNNILL, M.S., MASSARELLA, G.R. et ANDERSON, J.A. (1969) A comparison of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in status asthmaticus, in chronic bronchitis, and in emphysema. *Thorax* **24**: 176-179.

EADY, R.P., TRIGG, S. et ORR, T.S.C. (1978) Anaphylactic bronchoconstriction in rats immunized with antigen-coated latex particles. *Clin. Exp. Immunol.* **32**: 283-289.

- ELBON, C.L., JACOBY, D.B. et FRYER, A.D. (1995) Pretreatment with an antibody to interleukin-5 prevents loss of pulmonary muscarinic M<sub>2</sub> receptor function in antigen-challenged guinea pigs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **12**: 320-328.
- ENRIGHT, T., CHUA, S. et LIM, D.T. Pulmonary eosinophilic syndromes. (1989) *Annals Allergy* **62**: 277-283.
- ERGER, R.A. et CASALE, T.B. (1995) Interleukin-8 is a potent mediator of eosinophil chemotaxis through endothelium and epithelium. *Am. J. Physiol.* **12**: L117-L122.
- FABBRI, L.M., BOSCHETTO, P., ZOCCA, E., MILANI, G., PIVOROTTO, F., PLEBANI, M., BURLINA, A., LICATA, B., MAPP, CE. (1987) Bronchoalveolar neutrophilia during late asthmatic reactions induced by toluene disocyanate. *Am Rev. Respir. Dis.* **136**: 36-42.
- FILLEY, W.V., HOLLEY, K.E., KEPHART, G.M. et GLEICH, G.J. (1982) Identification by immunofluorescence of eosinophil granule major basic protein in lung tissues of patient with bronchial asthma. *Lancet* **2**: 11-16.
- FLAVAHAN, N.A., SLIFMAN, N.R. GLEICH, G.J. et VANHOUTTE, P.M. (1988) Human eosinophil major basic protein causes hyperreactivity of respiratory smooth muscle. Role of epithelium. *Am. Rev. Respir. Dis.* **138**: 685-688.

- FOLKERTS, G., VAN DER LINDE, H.J., OMINI, C. et NIJKAMP, F.P. (1993) Virus-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in the guinea pig is inhibited by levodropropizine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **348**: 213-219.
- FRICK, W.E., SEDWICK, J.B. et BUSSE, W.W. (1989) The appearance of hypodense eosinophils in antigen-dependent late phase asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **139**: 1401-1406.
- FRIGAS, E., LOERGERING, D.A. et GLEICH, G.J. (1980) Cytotoxic effects of the guinea pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium. *Lab Invest* **42**: 35-40.
- FRYER, A.D. et JACOBY, D.B. (1992) Function of pulmonary M<sub>2</sub> receptors in antigen challenged guinea pigs is restored by heparin and poly-l-glutamate. *J. Clin. Invest.* **91**: 2292-2298.
- FUKUDA, T. et GLEICH, G.J. (1985) Heterogeneity in eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* **83**: 369-373.
- FUKUDA, T., DUNNETTE, S.L., REED, C.E., ACKERMAN, S.J., PETERS, M.S., GLEICH, G.J. (1985) Increased numbers of hypodense eosinophils in the blood of patients with bronchial asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**: 981-985.

- GAVETT, S.H., CHEN, X., FINKELMAN, F., et WILLS-KARP, M. (1994). Depletion of murine CD4<sup>+</sup> T lymphocytes prevents antigen-induced airway hyperreactivity and pulmonary eosinophilia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **10**: 587-593.
- GIBSON, P.G., DOLOVICH, J., DENBURG, J., RAMSDALE, E.H. et HARGREAVE, F.E. (1989) Chronic cough: eosinophilic bronchitis without asthma. *Lancet* **1**: 1346-1348.
- GLEICH, G.J. (1990) The eosinophil and bronchial asthma: Current understanding. *J. Allergy Clin. Immunol.* **85**: 422-436.
- GLEICH, G.J., ADOLPHSON, C.R. et LEIFERMAN, K.M. (1993) The biology of the eosinophil leukocyte. *Annual Rev. Med.* **44**: 85-101.
- GLEICH, G.J., FLAVAHAN, N.A., FUJISAWA, T. et VANHOUTTE, P.M. (1988) The eosinophil as a mediator of damage to respiratory epithelium: a model for bronchial hyperreactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **81**: 776-781.
- GLEICH, G.J., FRIGAS, E., LOERGERING, D.A., WASSOM, D.L., et STEIMULLER, D. (1979) Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein. *J. Immunol.* **123**: 2925-2997.
- GLEICH, G.J., MOTOJIMA, S., FRIGAS, E., KEPHART, G.M., FUJISAWA, T. et KRAVIS, L.P. (1987) The eosinophilic leukocyte and

the pathology of fatal bronchial asthma: evidence for the pathologic heterogeneity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **80**: 412-415.

GOLDIE, R.G., FERNANDES, L.B., FARMER, S.G. et HAY, D.W.P. (1990) Airway epithelium-derived inhibitory factor. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**: 67-70.

GRAINGER, D.N., STENTON, S.C., AVERY, A.J., WALTERS, E.H. et HENDRICK, D.J. (1990) The relationship between atopy and non-specific bronchial responsiveness. *Clin. Exper. Allergy* **20**: 181-187.

GRIFFIN, E., HAKANSSON, L., FORMGREN, H., JORGENSEN, K., PETERSON, C. et VENGE, P. (1991) Blood eosinophil number and activity in relation to lung function in patients with asthma and with eosinophilia. *J. Allergy Clin. Immunol.* **87**: 548-557.

GUNDEL, R.H., GERRISTEN, M.E. et WEGNER, C.D. (1992a) Polymixin B-induced bronchial neutrophilia does not alter airway responsiveness to methacholine in cynomolgus monkeys. *Clin. Exp. Allergy* **22**: 357-363.

GUNDEL, R.H., GERRISTEN, M.E., GLEICH, G.J. et WEGNER, C.D. (1990) Repeated antigen inhalation results in a prolonged airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness in primates. *J. Appl. Physiol.* **68**: 779-786.

- GUNDEL, R.H., GERRITSEN, M.E. et WEGNER, C.D. (1992b) The role of intercellular molecule-1 in chronic airway inflammation. *Clin. Exp. Allergy* **22**: 569-575.
- GUNDEL, R.H., LETTS, L.G. et GLEICH, G.J. (1991) Human eosinophil major basic protein induces airway constriction and airway hyperresponsiveness in primates. *J. Clin. Invest.* **87**: 1470-1473.
- HAMID, Q., AZZAWI, M., YING, S., MOQBEL, R., WARDLAW, A.J., CORRIGAN, C.J., BRADLEY, B., DURHAM, S.R., COLLINS, J.V., JEFFERY, P.K., QUINT, D.J. et KAY, A.B. (1991) Expression of mRNA for interleukin 5 in mucosal bronchial biopsies from asthma. *J. Clin. Invest.* **87**: 1541-1546.
- HARGREAVE, F.E., DOLOVICH, J., O'BYRNE, P.M., RAMSDALE, H.E. et EDWIN, E. (1986) The origin of airway hyperresponsiveness. *J. Allergy Clin. Immunol.* **78**: 825-832.
- HASTIE, A.T., LOEGERING, D.A., GLEICH, G.J. et KUEPPERS, F. (1987) The effect of purified human eosinophil major basic protein on mammalian ciliary activity. *Am. Rev. Respir. Dis.* **135**: 848-853.
- HEUER, H.O., WENZ, B., JENNEWEIN, H.M. et URICH, K. (1994) Dissociation of airway responsiveness and bronchoalveolar lavage (BAL) cell composition in sensitized guinea-pigs after daily inhalation of ovalbumin. *Clin. Exp. Allergy* **24**: 682-689.

- HIRATA, K., MAGHNI, K., BERGEAT, P. et SIROIS, P. (1990) Guinea pig alveolar eosinophils and macrophages produce leukotriene B<sub>4</sub> but no peptido-leukotriene. *J. Immunol.* **144**: 1880-1885.
- HIRATA, K., PELÉ, J.P., ROBIDOUX, C et SIROIS, P. (1989) Guinea pig lung eosinophils purification and prostaglandin production. *J. Leuko. Biol.* **45**: 523-528.
- HOGG, J.C. Neutrophil kinetics and lung injury. (1987) *Physiol. Rev.* **67**: 1249-95.
- HORN, B.R., ROBIN, E.D., THEODORE, J. et VAN KESSEL, A. (1975) Total eosinophil counts in the management of asthma. *N. Engl. J. Pharmacol.* **292**: 1152-1155.
- HOWELL, R.E., SICKELS, B.D. et WEICHMAN, B.M. (1992) Comparison of the airway hyperreactivity produced by single and multiple antigen exposures in sensitized guinea pigs. *Agents Actions* **37**: 195-197.
- HUBSCHER, T. (1975) Role of eosinophil in allergic response. II. Release of prostaglandins from human eosinophilic leukocytes. *J. Immunol.* **114**: 1389-1319.
- HUTSON, P.A., CHURCH, M.K., CLAY, T.P., MILLER, P. et HOLGATE, S.P. (1988) Early and late phase bronchoconstriction after allergen challenge of nonanaesthetised guinea-pigs. I. The association of



disordered airway physiology to leukocyte infiltration. *Am. Rev. Respir. Dis.* **137**: 548-557.

HUTSON, P.A., VARLEY, J.G., SANJAR, S., KINGS, M., HOLGATE, S.T. et CHURCH, M.K. (1990) Evidence that neutrophils do not participate in the late-phase airway response provoked by ovalbumin inhalation in conscious, sensitized guinea pigs. *Am. Rev. Respir. Dis.* **141**: 535-539.

ICHINOSE, M. et BARNES, P.J. (1990) Bradykinin-induced airway microvascular leakage and bronchoconstriction are mediated via a bradykinin B<sub>2</sub> receptor. *Am. Rev. Respir. Dis.* **142**: 1104-1107.

IJIMA, H., ISHII, M., YAMAUCHI, K., CHAO, C.L., KIMURA, K., SHIMURA, S., SHINDOH, Y., INOUE, H., MUE, S. et TAKISHIMA, T. (1987) Bronchoalveolar lavage and histologic characterization of late asthmatic response in guinea pigs. *Am. Rev. Resp. Dis.* **136**: 922-929.

IJIMA, H., M. ISHII , K. YAMAUCHI , C.L. CHAO , K. KIMURA , S. SHIMURA , Y. SHINDOH , H. INOUE , S. MUE ET T. TAKISHIMA. (1987) Bronchoalveolar lavage and histologic characterization of late asthmatic response in guinea pig. *Am. Rev. Resp. Dis.* **136**: 922-929.

INGRAM, H.I. (1991) Asthma and airway hyperresponsiveness. *Annual. Rev. Med.* **42**: 139-150.

- ISHIDA, K., KELLY, L.J., THOMSON, R.J., BEATTIE L.L., et SCHELLENBERG R.R. (1989) Repeated antigen challenge induces airway hyperresponsiveness with tissue eosinophilia in guinea pigs. *J. Appl. Physiol.* **67**: 1133-1139.
- JACOBY, D.B., GLEICH, G.J. et FRYER, A.D. (1993) Human eosinophil major basic protein is an endogenous allosteric antagonist at the inhibitory muscarinic M<sub>2</sub> receptor. *J. Clin. Invest.* **91**: 1314-1318.
- JACOBY, D.B., UEKI, I.F., WIDDICOMBE, J.H., LOEGERING, D.A., GLEICH, G.J. et NADEL, J.A. (1988) Effect of human eosinophil major basic protein on ion transport in dog tracheal epithelium. *Am. Rev. Respir. Dis.* **137**: 13-16.
- JACQUES, C.A., SPUR, B.W., JOHNSON, M., LEE, T.H. (1992) The mechanism of LTE<sub>4</sub>-induced histamine hyperresponsiveness in guinea-pigs tracheal and human bronchial smooth muscle, in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **104**: 859-866.
- JAMES, A.L., PARÉ, P.D. et HOGG, J.C. (1989) The mechanics of airway narrowing in asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **140**: 242-246.
- JANCAR, S., DEGIACOBBI, G., MARIONO, M., SIROIS, P. et BRAQUET, P. (1988) Involvement of platelet-activating factor in acute immune-complex-induced pancreatitis. In *New Trends in Lipid Mediators Research*. ed. by P. Braquet, Karger, Basel. **2**: 194-198.

- JEFFREY, P.K., WARDLAW, A.J., NELSON, F.C., COLLINS, J.V. et KAY, A.B. (1989) Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.* **140**: 1745-1753.
- JIANG, H., RAO, K., HALAYKO, A.J., LIU, X. et STHEPHENS, N.L. (1992) Ragweed sensitization-induced increase of myosin light chain kinase content in canine airway smooth muscle. *Am. J. Respir. Cell Mol. Physiol.* **7**: 567-573.
- JOSE, P.J., GRIFFITHS-JOHNSON, D.A., COLLINS, P.D., WALSH, D.T., MOQBEL, R., TOTTY, N.F., TRUONG, O., HSUAN, J.J. et WILLIAMS, T.J. (1994) Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J. Exp. Med.* **179**: 881-887.
- KAJITA, T., YUI, Y., MITA, H., TANIGUCHI, N., SAITO, H., MISHIMA, T., SHIDA, T. (1985) Release of leukotriene C<sub>4</sub> from human eosinophils and its relationship to the cell density. *Int. J. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **78**: 406-410.
- KAMEYOSHI, Y., DORSCHNER, A., MALLET, A.I., CHRISTOPHERS, E. et SCHRÖDER, J.M. (1992) Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J. Exp. Med.* **176**: 587-592.

- KAPLAN, A.P., KUNA, P. et REDDIGARI, S.R. (1994) Chemokines as allergic mediators: relationship to histamine-releasing factors. *Allergy* **49**: 495-501.
- KAROL, M.H. (1994) Animal models of occupational asthma. *Eur. Respir. J.* **7**: 555-568.
- KAZURA, J.W., FANNING, M.M., BLUMER, J.L. et MAHMOUD, A.A. (1981) Role of cell-generated hydrogen peroxide in granulocyte-mediated killing of schistosomes of *schistosomula mansonii in vitro*. *J. Clin. Invest.* **67**: 93-102.
- KIMURA K., INOUE, H., ICHINOSE, M., MIURA, M., KATSUMATA, U., TAKAHASHI, T. et TAKISHIMA, T. (1992) Bradykinin causes airway hyperresponsiveness and enhances maximal airway narrowing. Role of microvascular leakage and airway edema. *Am. Rev. Respir. Dis.* **146**: 1301-1305.
- KINGS, M.A., CHAPMAN, I., KRISTERSSON, A., SANJAR, S. et MORLEY, J. (1990) Human recombinant lymphokines and cytokines induce pulmonary eosinophilia in the guinea pig which is inhibited by Ketotifen and AH 21-132. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **91**: 354-361.

- KIRBY, J.G., HARGREAVE, F.E., GLEICH, G.J. et O'BYRNE, P.M. (1987) Bronchoalveolar cell profiles of asthmatic and nonasthmatic subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* **136**: 379-383.
- KLERX, J.P.A.M., BEUKELMAN, C.J., VAN DIJK, H. et WILLERS, J.M.N. (1983) Microassay for colorimetric estimation of complement activity in guinea pig, human and mouse serum. *J. Immunol. Methods.* **63**: 215-220.
- KONG, S.K., HALAYKO, A.J. et STEPHENS, N.L. (1990) Increased myosin phosphorylation in sensitized canine tracheal smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **8**: L53-L56.
- KONIETZKO, N. (1986) Mucus transport and inflammation. *Eur. J. Respir. Dis.* **69**: 72-79.
- KROEGEL, C., LIU, M., HUBBARD, W.M., LICHTENSTEIN, L.M. et BOCHNER, B.S. (1994) Blood and bronchoalveolar eosinophils in allergic subjects following segmental antigen challenge. Surface phenotype, density heterogeneity and prostanoid production. *J. Allergy Clin. Immunol.* **93**: 725-734.
- KUBIN R., DESCHL, U, LINSSEN, M. et WILHELMS O-H. (1992) Intratracheal application of Sephadex in rats leads to massive pulmonary eosinophilia without bronchial hyperreactivity to acetylcholine. *Int Arch Allergy Immunol.* **98**: 266-272.

- KUO, H-P., YU, C-T. et YU, C-T. (1994) Hypodense esoinophil number relates to clinical severity, airway hyperresponsiveness and response to inhaled corticosteroids in asthmatic subjects. *Eur. Respir. J.* **7**: 1452-1459.
- LABERGE, S., RABB, H., ISSEKUTZ, T.B. et MARTIN, J.G. (1995) Role of VLA-4 and LFA-1 in allergen-induced airway hyperresponsiveness and lung inflammation in the rat. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**: 822-829.
- LACOSTE, J-Y, BOUSQUET, J., CHANEZ, P., VAN VYVE, T., SIMONY-LAFONTAINE, J., LEQUEU, N., VIC, P., ENANDER, I., GODARD, P. et MICHEL, F-B. (1993) Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **92**: 537-548.
- LAITINEN, L.A., HEINO, M., LAITINEN, A., KAVA, T. et HAAHTELA, T. (1985) Damage of the airway epithelium and bronchial hyperreactivity in patients with asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **131**: 599-606.
- LAITINEN, L.A., LAITINEN, A., HEINO, M. et HAAHTELA, T. (1991) Eosinophilic airway inflammation during exacerbation of asthma and its treatment with inhaled corticosteroid. *Am. Rev. Respir. Dis.* **143**: 423-427.

- LASSALLE, P., SERGANT, M., DELNESTE, Y., GOSSET, P., WALLAERT, B., ZANDECKI, M., CAPRON, A., JOSEPH, M. et TONNEL, A.B. (1992) Levels of soluble IL-2 receptor in plasma from asthmatics. Correlations with blood eosinophils, lung function, and corticosteroid therapy. *Clin. Exp. Immunol.* **87**: 266-271.
- LAVIOLETTE, M., CORMIER, Y., LOISEAU, A., SOLER, P., LEBLANC, P., HANCE, A.J. (1991) Bronchoalveolar mast cells in normal and farmers and subjects with farmer's lung. Diagnostic, prognostic, and physiologic significance. *Am. Rev. Respir. Dis.* **144**: 855-860.
- LAYCOCK, S.M., H. SMITH et B.A. SPICER. (1986) Airway hyper-reactivity and blood, lung and airway eosinophilia in rats treated with Sephadex particles. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* **81**: 363-367.
- LEE, T., LENIHAN, D.J., MALONE, B., RODDY, L.L., et WASSERMAN, S.I. (1984) Increased biosynthesis of platelet-activating factor in activated human eosinophils. *J. Biol. Chem.* **259**: 5526-5530.
- LELLOUCH-TUBIANA, A., J. LEFORT, M.T. SIMON, A. PFISER, et B.B. VARGAFTIG. (1988) Eosinophil recruitment into guinea pig lungs after PAF-acether and allergen administration. Modulation by prostacyclin, platelet depletion and selective antagonists. *Am. Rev. Resp. Dis.* **137**: 948-954.

- LEMANSKE, R.F. et KALINER M.A. (1982) The experimental production of increased eosinophils in rat-phase reactions. *Immunology* **45**: 561-568.
- LIST, S.J., FINDLAY, B.P., FORSTNER, G.G. et FORSTNER, J.F. (1978) Enhancement of the viscosity of mucin by serum albumin. *Biochem. J.* **175**: 565-571.
- LOHMANN-MATTHES, M-L., STEINMÜLLER, C. et FRANKE-ULLMANN, G. (1994) Pulmonary macrophages. *Eur. Respir. J.* **7**: 1678-1689.
- LOZEWICZ, S., WELLS, C., GOMEZ, E., FERGUSON, H., RICHMAN, P., DEVALIA, J. et DAVIES R.J. (1990) Morphological integrity of the bronchial epithelium in the mild asthma. *Thorax* **45**: 12-5.
- LUKACS, N.W., STRIETER, R.M., CHENSUE, S.W., KUNKEL, S.L. (1994) Interleukin-4-dependent pulmonary eosinophil infiltration in a murine model of asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **10**: 526-532.
- MAGHNI, K., BLANCHETTE, F. et SIROIS, P. (1993) Induction of lung eosinophilia and neutrophilia in guinea pigs following injection of Sephadex beads. *Inflammation* **17**: 537-550.
- MAGHNI, K., DE BRUM-FERNANDES, A.J., FOLDES-FILEP, E., GAUDRY, M., BERGEAT, P. et SIROIS, P. (1991) Leukotriene B<sub>4</sub>



receptors on guinea-pig alveolar eosinophils. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **258**: 784-789.

MAGHNI, K., LANOUE, C., CLOUTIER, S., CRISTOL, J.P., CADIEUX, A. et SIROIS, P. (1992) Sephadex bead-induced bronchial hyperreactivity and airway eosinophilia. *Pharmacologist* **34**: 358.

METZGER, W.J., RICHERSON, H.B., WORDEN, K., MONICK, M. et HUNNINGHAKE, G.W. (1986) Bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic patients following allergen bronchoprovocation. *Chest* **89**: 477-483.

MICHEL, F.B., GODARD, P. et BOUSQUET, J. (1989) Usefulness of bronchoalveolar lavage in asthmatics. The right clinical practice. *Intern. Arch. Allergy Appl. Physiol.* **88**: 101-107.

MISEROCCHI, G., NEGRINI, D., DEL FABBRO, M. et VENTUROLI, D. (1993) Pulmonary interstitial pressure in intact in situ lung: transition to interstitial edema. *J. Pharmacol. Physiol.* **74**: 1171-1177.

MORENO, R.H., HOGG, J.G. et PARE, P.D. (1986) Mechanics of airway narrowing. *Am. Rev. Respir. Dis.* **133**: 1171-1180.

MOSSMAN, T.R. et COFFMAN, R.L. (1987) Two types of mouse helper T cell clones. Implications for immune regulation. *Immunol. Today* **8**: 223-227.

- MOTOJIMA, S., FRIGAS, E., LOEGERING, D.A., GLEICH, G.J. (1989)  
Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal  
epithelium *in vitro*. Am. Rev. Respir. Dis. **139**: 801-805.
- NAYLOR, B. (1962) The shedding of the mucosa of the bronchial tree in  
asthma. Thorax **17**: 69-74.
- NISHIKAWA, M., IKEDA, H., FUKUDA, T., SUZUKI, S. et OKUBO, T.  
(1990) Acute exposure to cigarette smoke induces airway  
hyperresponsiveness without airway inflammation in guinea pigs.  
Dose-responses characteristics. Am. Rev. Resp. Dis. **142**: 177-183.
- OBATA, H., TAO, Y., KIDO, M., NAGATA, N., TANAKA, N. et  
KUROIWA, A. (1992) Guinea pig model of immunologic asthma  
induced by inhalation of trimellitic anhydride. Am. Rev. Respir. Dis.  
**146**: 1553-1558.
- OHASHI, Y., MOTOJIMA, S., FUKUDA, T. et MAKINO, S. (1992) Airway  
hyperresponsiveness, increased intracellular spaces of bronchial  
epithelium, and increased infiltration of eosinophils and lymphocytes  
in bronchial mucosa in asthma. Am. Rev. Respir. Dis. **145**: 1469-1476.
- OHNO, I., LEA, R.G., FLANDERS, K.C. CLARK, D.A., BANWATT, D.,  
DOLOVICH, J., DENBURG, J., HARLEY, C.B., GAULDIE, J. et  
JORDANA, M. (1992) Eosinophils in chronically inflamed human

upper airway tissue express transforming growth factor- $\beta$ 1 gene (TGF- $\beta$ 1). *J. Clin. Invest.* **89**: 1662-1668.

OLIVIERI, D. et FORESI, A. (1992) Correlation between cell content of bronchoalveolar lavage (BAL) and histologic findings in asthma. *Respiration* **59**: 3-5.

OOSTERHOUT, A.J.M., LADENIUS, A.R.C., SAVELKOUL, H.F.J., VON ARK, I., DELSMAN, K.C. et NIJKAMP, F.P. (1993) Effect of anti-IL-5 and IL-5 on airway hyperreactivity and eosinophils in guinea-pig. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**: 548-552.

OREHEK, J., GAYRARD, P., SMITH, A.P., GRIMAUD, C. et CHARPIN, J. (1977) Airway response to carbachol in normal and asthmatic subjects. Distinction between bronchial sensitivity and reactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.* **115**: 937-943.

PEPYS, J. (1994) "Atopy": a study in definition. *Allergy* **49**: 397-399.

PIERCY, V., ARCH, J.R.S., BAKER, R.C., COOK, R.M., HATT, P.A., et SPICER, B.A. (1993) Effects of dexamethasone in a model of lung hyperresponsiveness in the rat. *Agents Actions* **39**: 118-125.

PINCUS, S.H. (1978) Production of eosinophil-rich guinea pig peritoneal exudates. *Blood* **52**: 127-134.

- PRICE, A.M., WEBBER, S.E. et WIDDICOMBE, J.G. (1989) Transport of albumin by the rabbit trachea in vitro. *J. Appl. Physiol.* **408**: 457-462.
- PRIN, L., CAPRON, M., TONNEL, A.B., BLETRY, O. et CAPRON, A. (1983) Heterogeneity of human peripheral blood eosinophils: viability in cell density and cytotoxic ability in relation to the level and the origin of hypereosinophilia. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **72**: 336-346.
- PUERINGER, R.J. et HUNNINGHAKE, G.W. (1992) Inflammation and airway reactivity in asthma. *Am. J. Med.* **92**: 32s-38s.
- RAEBURN, D. (1990) Putative role of epithelial derived-factors in airway smooth reactivity. *Agents Actions* **31**: 259-274.
- RAMSDALE, E.H., MORRIS, M.M., ROBERTS, R.S. et HAGREAVE, F.E. (1984) Bronchial responsiveness to methacholine in chronic bronchitis: relationship to airflow obstruction and cold air responsiveness. *Thorax* **39**: 912-918.
- RAND, T.H., CRUIKSHANK, W.W., CENTER, D.M., WELLER, P.F. (1991a) CD4-mediated stimulation of human eosinophils: lymphocyte chemoattractant factor and other CD4-binding ligands elicit eosinophil migration. *J. Exp. Med.* **173**: 1521-1528.

- RAND, T.H., SILBERSTEIN, D.S., KORNFELD, H. et WELLER, P.F. (1991b) Human eosinophil express functional interleukin-2 receptors. *J. Clin. Invest.* **88**: 825-832.
- RENKI, E.M. (1992) Cellular and intercellular transport pathways in exchange vessels. *Am. Rev. Respir. Dis.* **146**: S28-S31.
- ROBINSON, D.S., HAMID, Q., YING, S. TSICOPOULOS, A., BARKANS, J., BENTLEY, A.M., CORRIGAN, C., DURHAM, S.R., KAY, A.B. (1992) Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N. Engl. J. Med.* **326**: 298-304.
- ROGERS, D.F., ALTON, E.W.F.W., AURSUDKIJ, B., BOSCHETTO, P., DEAR, A. et BARNES, P.J. (1990) Effects of platelet activating factor on the formation and composition of airway fluid in guinea-pig trachea. *J. Physiol.* **431**: 643-648.
- ROSSI, G.A., CRIMI, E., LANTERO, S., GIANIORO, P., ODDERA, S., CRIMI, P. et BRUSASCO, V. (1991) Late phase reaction to inhaled allergen is associated with early recruitment of eosinophils in the airways. *Am. Rev. Respir. Dis.* **144**: 379-383.
- ROT, A., KRIEGER, M., BRUNNER, T., BISCHOFF, S.C. et SCHALL, T.J. (1992) RANTES and macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  induce the migration and activation of normal eosinophil granulocytes. *J. Exp. Med.* **176**: 1489-1495.

ROTHENBERG, M.E., PETERSEN, J., STEVENS, R.L., SILBERSTEIN, D.S., McKENZIE, D.T., AUSTEN, K.F., OWEN' W.F Jr. (1989) IL-5-dependent conversion of normodense human eosinophils to hypodense phenotype uses 3T3 fibroblasts for enhanced viability, accelerated hypodensity and sustained antibody-dependent cytotoxicity. *J. Immunol.* **143**: 2311-2316.

SAETTA, M., Di STEFANO, A., MAESTRELLI, P., De MARZO, N., MILANI, G.F., PIVIROTTO, F., MAPP, C.E. et FABBRI, L.M. (1992) Airway inflammation in occupational asthma induced by toluene diisocyanate. *Am. Rev. Respir. Dis.* **145**: 160-168.

SANDERSON, C.J. (1992) Interleukin-5, eosinophils and disease. *Blood* **79**: 3001-3009.

SANJAR, S., AOKI, S., KRISTERSSON, A. SMITH, D., et MORLEY, J. (1990) Antigen challenge induces pulmonary airway eosinophil accumulation and airway hyperreactivity in sensitized guinea-pigs: the effect of anti-asthma drugs. *Br. J. Pharmacol.* **99**: 679-986.

SCHRIEBER, R.A. et D. ZUCKER-FRANKLIN D. (1974) A method for the induction of blood eosinophilia with simple protein antigen. *Cellular Immunol.* **14**: 470-474.

SCHRIEBER, R.A. et D. ZUCKER-FRANKLIN D. (1975) Induction of blood eosinophilia by pulmonary embolization of antigen-coated particles:

The relationship to cell-mediated immunity. *J. Immunol.* **114**: 1348-1353.

SCHWENK, U., MORITA, E., ENGEL, R. et SCHRODER, J.M. (1992) Identification of 5-oxo-15-hydroxy-6, 8, 11, 13-eicosatetraenoic acid as a novel and potent human eosinophil chemotactic eicosanoid. *J. Biol. Chem.* **267**: 12482-12488.

SEARS, M.R., BURROWS, B., FLANNERY, E.M., HERBISON, G.P., HEWITT, C.J. et HOLDAWAY, M.D. (1991) Relationship between airway hyperresponsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. *N. Engl. J. Med.* **325**: 1067-1071.

SERVAIS, G., WALMAGH, J. et DUCHATEAU, J. (1991) Simple quantitative haemolytic microassay for the determination of complement alternative pathway activation (AP 50). *J. Immunol. Methods* **140**: 93-100.

SIMANI, A.S., INOUE, S. et HOGG, J.C. (1974) Penetration of the respiratory epithelium of guinea-pigs following exposure to cigarette smoke. *Lab. Invest.* **31**: 75-80.

SIROIS, M.G., JANCAR, S., BRAQUET, P., PLANTE, G.E. et SIROIS, P. (1988) PAF increases vascular permeability in selected tissues: effect of BN-52021 and L655, 240. *Prostaglandins* **36**: 631-644.

- SMITH, H. (1992) Asthma inflammation, eosinophils and bronchial hyperreponsiveness. *Clin. Exper. Allergy* **22**: 187-197.
- SORDEN, S.D., LEMANSKE, R.F. Jr. et CASTLEMAN W.L. (1990) Pulmonary eosinophilia and granulomatous pulmonary arteritis induced in rats intravenous Sephadex. *vet. pathol.* **27**: 217-222.
- SPICER, B.A., BAKER, R.C., HATT, P.A., LAYCOCK, S.M. et SMITH H. (1990) The effects of drugs on Sephaedx-induced eosinophilia and lung hyer-reponsiveness in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **101**: 821-828.
- SPICER, B.A., BAKER, R.C., LAYCOCK, S.M. et SMITH, H. (1989) Correlation between blood eosinophilia and airway hyper-responsiveness in rats. *Agents Actions* **26**: 63-65.
- STRATH, M. et C.J. SANDERSON. (1986a) Detection of eosinophil differentiation factor its relationship to eosinophilia in *Mesocestosis corti*-infected mice. *Exp. Hematol.* **14**: 16-20.
- STRATH, M., WARREN, D.J. et SANDERSON, C.J. (1986b) Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *J. Immunol. Methods* **83**: 209-215.
- SUN, J., ELWOOD, W., HACZKU, A., BARNES, P.J., HELLEWELL, P.G., CHUNG, K.F. (1994) Contribution of intercellular-adhesion molecule-



1 in allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation in sensitized brown-Norway rats. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **104**: 291-295.

SUN, X.H., W.B. DAVIS, Y. FUKUDA , V.J. FERRANS et R.G. CRYSTAL. (1985) Experimental polymyxin B-induced interstitial lung disease characterized by an accumulation of cytotoxic eosinophils in the alveolar structures. *Am. Rev. Resp. Dis.* **131**: 103-108.

SVEDMYR, N. (1984) Szentivanyi's hypothesis of asthma. *Eur. J. Respir. Dis.* **136**: 59-65.

TAUBER, A.I., GOETZL, E.J. et BABIOR, B.M. (1979) Unique characteristics of superoxide production by human eosinophils in eosinophilic states. *Inflammation* **3**: 261-269.

THOMPSON, A.B., ROBBINS, R.A., ROMBERGER, D.J., SISSON, J.H., SPURZEM, J.R., TESCHLER, H. et RENNARD, S.I. (1995) Immunological functions of the pulmonary epithelium. *Eur. Respir. J.* **8**: 127-149.

THOMPSON, J., SCYPINSKI, L., GORDON, T et SHEPPARD, D. (1986) Hydroxyurea inhibits airway hyperresponsiveness in guinea pigs by a granulocyte-independent mechanism. *Am. Rev. Respir. Dis.* **134**: 62-68.

UCHIDA, D.A., ACKERMAN, S.J., COYLE, A.J., LARSEN, G.L., WELLER, P.F., FREED, J. et IRVIN, C.G. (1993) The effect of human eosinophil major basic protein on airway responsiveness in the rat in vivo. A comparison with polycations. *Am. rev. Respir. dis.* **147**: 982-988.

VIDEM, V., et MOLLNES, T.E. (1994) Human complement activation by polygeline and dextran 70. *Scan. J. Immunol.* **39**: 314-320.

WALKER, C., BODE, E., BOER, L., HANSEL, T.T., BLASER, K. et VIRCHOW, J.C. (1992) Allergic and non-allergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am. Rev. Respir. Dis.* **146**: 109-115.

WALKER, C., KAEGI, M.K, BRAUN, P. et BLASER, K. (1991) Activated T lymphocytes and eosinophilia in bronchoalveolar lavage from subjects with asthma correlated with disease severity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **88**: 935-942.

WALKER, C., KAEGI, M.K., BRAUN, P. et BLASER, K. (1991) Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **88**: 935-942.

WALLS, A.F., RHEE, Y.K., GOULD, D.J., WALTERS, C., ROBINSON, C., CHURCH, M.K. et HOLGATE, S.T. (1991) Inflammatory mediators and cellular infiltration in a guinea pig model of the late asthmatic reaction. *Lung* **169**: 227-240.

WALLS, A.F., RHEE, Y.K., GOULD, D.J., WALTERS, C., ROBINSON, M.K., CHURCH, M.K., HOLGATE, S.T. (1991) Inflammatory mediators and the cellular infiltration of the lungs in a guinea pig model of the late asthmatic reaction. *Lung* **169**: 227-240.

WALLS, R.S. et P.B. BEESON. (1972) Mechanism of eosinophilia. IX. Induction of eosinophilia in rats by certain forms of Dextran. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **140**: 689-693.

WANG, J.M., RAMBALDI, A., BIONDI, A., CHEN, Z.G., SANDERSON, C.J. et MANTOVANI, A. (1989) Recombinant human interleukin-5 is a selective eosinophil chemoattractant. *Eur. J. Immunol.* **19**: 701-705.

WARDLAW, A.J., DUNNETTE, S., GLEICH, G.J., COLLINS, J.V. et KAY, A.B. (1988) Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma: relationship to bronchial hyperreactivity. *Am. Rev. Respir.* **137**: 62-69.

WARDLAW, A.J., MOQBEL, R., CROMWELL, O. et KAY, A.B. (1986) Platelet-activating factor: a potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils. *J. Clin. Invest.* **78**: 1701-1706.

- WATSON, J.W., COHAN, V.L., SHAY, A.K., FREIERT, K.W. (1992)  
Multiple antigen challenge produces pulmonary eosinophilia but not  
pulmonary hyperresponsiveness in actively sensitized guinea pigs.  
*Agents Actions* **37**: 174-177.
- WEGNER, C.D., GUNDEL, R.H., REILLY, P., HAYNES, N., LETTS, L.G.  
et ROTHLEIN, R. (1990) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)  
in the pathogenesis of asthma. *Science* **247**: 456-459.
- WEISS, S.J., TEST, S.T., ECKMANN, R. et REGIANI, S. (1986)  
Brominating oxidants generated by human eosinophils. *Science* **234**:  
200-203.
- WELINDER, K.G. (1979) Amino acid sequence of horseradish peroxidase.  
Amino and carboxyl termini, cyanogen bromide and tryptic  
fragments, the complete sequence, and some structural characteristics  
of horseradish peroxidase C. *Eur. J. Biochem.* **96**: 483-502.
- WENZEL, S.E., FOWLER, A.A. III et SCHWARTZ, L.B. (1988) Activation  
of pulmonary mast cells by bronchoalveolar allergen challenge: In  
vivo release of histamine and tryptase in atopic subjects with and  
without asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **137**: 1002-1008.
- WHITE, S.R., KULP, G.V.P., SPAETHE, S.M., Van ALTSYNE, E., et  
LEFF, A.R. (1991) A kinetic assay for eosinophil peroxidase activity in

eosinophils and eosinophil conditioned media. *J. Immunol. Methods* **44**: 257-263.

WHITE, S.R., OHNO, S., MUNOZ, N.M., GLEICH, G.J., ABRAHAMS, C., SOLWAY, J. et LEFF A.R. (1990) Epithelium-dependent contraction of airway smooth muscle caused by eosinophil MBP. *J. Appl. Physiol.* **259**: L294-L303.

WILLIAMS, I.P., RICH, B. et RICHARDSON, P.S. (1983) Action of serum on the output of secretory glycoproteins from the human bronchi in vitro. *Thorax* **38**: 682-685.

WOOLCOCK, A.J., ANDERSON, S.D., PEAT, J.K., DUTOIT, J.I., ZHANG, Y.G., SMITH, C.M., SALONE, C.M. (1991) Characteristics of bronchial hyperresponsiveness in chronic obstructive pulmonary disease and in asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **143**: 1438-1843.

YAMADA, N., OHGAKI, M. et MURAMATSU, M. (1994) Antigen-induced airway hyperresponsiveness is associated with infiltration of eosinophils in lung tissue, but not with bronchoalveolar lavage eosinophilia or neutrophilia. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **103**: 73-78.

YOUSEFI, S., GREEN, D.R., BLASER, K. et SIMON, H-V. (1994). Protein-tyrosine phosphorylation regulates apoptosis in human eosinophils and neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 10868-10872.

YUKAWA, T., KROEGEL, C., EVANS, P., FUKUDA, T., CHUNG, K.F.,  
BARNES, P.J. (1989) Density heterogeneity of eosinophils: induction of  
hypodense eosinophils by platelet-activating factor. *Immunology* **68**:  
140-143.

ZAPOL, W.M., RIMAR, S., GILLIS, N., MARLETTA, M. et BOSKEN,  
C.H. (1994) Nitric oxide and the lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **149**:  
1375-1380.